

Aus der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik am Klinikum Südstadt  
Rostock  
Prof. Dr. med. habil. Volker Briese

**Stimulation von humanen Karzinomzelllinien des Endometriums  
mit Leinsamenrohextrakt, Lignanen sowie deren Metaboliten  
und der Effekt auf das Wachstumsverhalten  
und die Zytotoxizität**

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Rostock 2014

vorgelegt von

Semira Hein, geb. am 30.05.1968 in Jajce/Bosnien  
aus Rostock

**Gutachter:**

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. habil. Volker Briesse,  
Universitätsfrauenklinik und Poliklinik am Klinikum Südstadt Rostock,  
Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. habil. Marek Lommatzsch,  
Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Pneumologie, Universität Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Udo Jeschke,  
Klinikum d. Universität München Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und  
Geburtshilfe, Campus Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München

**Datum der Einreichung:** 19. September 2014

**Datum der Verteidigung:** 03. März 2015



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1. Endogene Östrogene .....	3
2.1.1. Definition	3
2.1.2. Physiologische Wirkung der endogenen Östrogene	3
2.1.3. Struktur und Biosynthese der Östrogene	4
2.1.4. ER und ihre molekularen Wirkmechanismen	5
2.1.5. ER und die Signaltransduktion bei bestimmten Krebsarten	6
2.2. Phytoöstrogene .....	6
2.2.1. Definition	7
2.2.2. Einteilung, Vorkommen und Struktur der Phytoöstrogene	7
2.2.3. Bioverfügbarkeit, Metabolismus und Pharmakokinetik der Phytoöstrogene	8
2.2.4. Physiologische Wirkung der Phytoöstrogene	9
2.2.5. Podophyllotoxin	10
2.2.6. Phytoöstrogene und Hormonersatztherapie	10
2.2.7. Physiologische Wirkungen des Leinsamen	11
2.3. SERM-selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren .....	11
2.4. Endometrium .....	13
2.4.1. Die Wirkung von Östrogenen am Uterus	13
2.4.2. Endometriumkarzinom: Entstehung, Inzidenz, Pathogenese und zugrunde liegende Risikofaktoren	14
2.4.3. Bekannte Wirkung von Phytoöstrogenen am Uterus	15
3. Material und Methoden	15
3.1. Materialien	16
3.1.1. Laborgeräte und Software	16
3.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	16
3.1.3. Testsysteme	18
3.1.4. Zelllinien	18
3.1.5. Leinsamen, Lignane und 17- $\beta$ -Östradiol	18
3.2. Nährmedien und Lösungen.....	19

3.2.1. Zusammensetzung der Zellkulturmedien und -lösungen	19
3.2.2. Strippen des Feta-Bovine-Serums	20
3.3. Methoden	21
3.3.1. Die getesteten Substanzen	21
3.3.2. Löslichkeitsversuche und Lösungsmiteleinfluss bei den verwendeten Zelllinien	22
3.3.3. Chemische Analytik	23
3.3.4. Bereitstellung des Leinsamenrohextraktes, der Lignane und des 17- $\beta$ -Östradiols für die Stimulationsversuche	27
3.3.5. Zellkultivierung	28
3.3.6. Zelltestung	32
3.3.7. Zusammenfassung des methodischen Ablaufs der Untersuchung	35
3.3.8. Statistische Auswertung	36
4. Ergebnisse	37
4.1. Ergebnisse der Löslichkeitsversuche und des Lösungsmiteleinflusses	37
4.2. Ergebnisse der Strukturanalyse des Leinsamenrohextraktes mittels HPLC-MS	40
4.3. Ergebnisse der Zellkultivierung	41
4.3.1. Kultivierung der Zelllinie Ishikawa	42
4.3.2. Kultivierung der Zelllinie RL95-2	42
4.3.3. Kultivierung der Zelllinie MFE-280	43
4.4. Ergebnisse der immunzytochemischen Charakterisierung	44
4.5. Ergebnisses des MTT-Assay	45
4.5.1. MTT-Test mit Leinsamenrohextrakt	45
4.5.2. MTT-Test mit Lignanen	49
4.6. Ergebnisses des BrdU-Assays	56
4.6.1. BrdU-Test mit Leinsamenrohextrakt	56
4.6.2. BrdU-Test mit Lignanen	60
5. Diskussion	67
5.1. Zusammenstellung der Ergebnisse	67
5.1.3. Inter-Zelllinien-Validität	70
5.2. Die Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit	72
5.3. Die Abhängigkeit von der Zelllinie	74
5.3.1. Die Abhängigkeit von der Ishikawa-Zelllinie	74
5.3.2. Die Abhängigkeit von der RL95-2-Zelllinie	75
5.3.3. Die Abhängigkeit von der MFE-280-Zelllinie	75

5.4. Die Abhängigkeit vom Lösungsmittel .....	77
5.5. Die Abhängigkeit vom FKS .....	77
5.6. Interpretation der Ergebnisse.....	77
5.6.1. <i>Interpretation der Ergebnisse nach Stimulation mit den Kontrollsubstanzen Podophyllotoxin                     und 17-<math>\beta</math>-Östradiol</i>	77
5.6.2. <i>Interpretation der Ergebnisse nach Stimulation mit dem Leinsamenrohextrakt und den                     Lignanen</i>	79
5.7. Zusammenfassung und Ausblick.....	83
6. Thesen	86
7. Literaturverzeichnis	88
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	102

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
amu	Atomic mass unit
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-Triphosphat
BrdU	5-Bromo-2'-deoxy-Uridine
bspw.	beispielsweise
CD-FCS	charcoal-dextran treated fetal calf serum
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAB	Diaminobenzidin
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleotidacid
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-Acetate
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ER	Östrogenrezeptor
EREs	Estrogen response elements
ER-α	Östrogenrezeptor alpha
ER-β	Östrogenrezeptor beta
ESI	Elektrosprayionisation
FBS	Fetal Bovine Serum
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography- Massenspektrometrie
HPV	Humane Papillomviren

HRT	Hormone replacement therapy (Hormonersatztherapie)
HSP90	Hitzeschockprotein
IC50	Inhibierende Konzentration, 50 %
IE	Internationale Einheit
IGF	Insulin-like growth factor
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LC-MS	Liquid-Chromatography-Massenspektrometrie
m	Masse
M	Molare Masse
mol	Mol
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid
nm	Nanometer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.a.	pro Jahr
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salz- lösung)
pg/ml	Picogramm pro Milliliter
pM	Picomolar
SDG	Secoisolariciresinoldiglucosid
SERM	Selective estrogen receptor modulators
US	Vereinigte Staaten von Amerika
U/min	Umdrehungen pro Minute
UK	Vereinigtes Königreich
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
z.B.	zum Beispiel



## **1. Einleitung und Zielsetzung**

Lasst Eure Nahrungsmittel Eure Heilmittel sein und Eure Heilmittel Eure Nahrungsmittel! (2)

Schon Hippokrates vermutete, dass Ernährung die Gesundheit beeinflusst. In der traditionellen Chinesischen Medizin, der Naturheilkunde und Homöopathie ist eine Vielzahl von Pflanzen bekannt, die seit Jahrhunderten zur Heilung verwendet werden. Phytoöstrogenen, die Gegenstand dieser Arbeit sind, wird bei unterschiedlichen Beschwerden immer wieder eine gute oder gar hervorragende Wirksamkeit bestätigt (3-9). Die niedrige Karzinommortalitätsrate in asiatischen Staaten, in denen reichlich Sojaprodukte zur Ernährung gehören, scheint die Hypothese zur protektiven antikanzerogenen Eigenschaften der Phytoöstrogene zu unterstützen (10-14). Auch wird in Migrationsstudien (15-19) gemutmaß, dass Lebensstil und Ernährung die Tumorentstehung stark beeinflussen. Je länger die ursprünglichen Lebens- und Essgewohnheiten zugunsten europäischer und amerikanischer aufgegeben wurden, desto größer war die Zahl der hormonabhängigen Tumore (20, 21). Unterschiede bezüglich der Krebsinzidenz bestanden bei den Nachkommen der zweiten Generation fast nicht mehr (15). Eine essenzielle Rolle mit tumorprotektivem Effekt scheint dabei den Phytoöstrogenen zuzukommen (11, 22-24). Somit stieg das Interesse an sekundären Pflanzenstoffen deutlich. Der Markt für pflanzliche Arzneimittel boomt, es werden vermehrt wissenschaftliche Untersuchungen mit Phytoöstrogenen durchgeführt (25-27). Daneben werden, vor allem populärwissenschaftlich, Empfehlungen zur vermehrten Einnahme von Phytoöstrogenen gegeben. Viele Studien (23, 28, 29) scheinen die positive Wirksamkeit pflanzlicher Produkte auf verschiedenen Ebenen zu belegen. Außerdem genießen Letztgenannte eine höhere Akzeptanz als industrielle Hormonpräparate.

Obwohl die Anwendung von pflanzlichen Alternativen eine lange Tradition hat, fehlen wissenschaftliche Belege über die positiven Wirkungen. Sind Untersuchungen vorhanden, so entpuppen sie sich oft als fehlerhaft oder auch unzureichend (30-32). Das Augenmerk lag auf der positiven Wirkung der pflanzlichen Wirkstoffe und vernachlässigte

damit unerwünschte Nebenwirkungen. So führten Analysen zur Wirkung von Phytoöstrogenen zu Kontroversen. Einerseits zeigten sich positive (33-35) aber auch negative Effekte unter Exposition mit Phytoöstrogenen (32, 36-38). In vitro und im Tierversuch senkten Phytoöstrogene (39, 40) die Inzidenz chemisch induzierter Mammatumoren, doch sie zeigten ebenso einen uterotrophen Effekt (41, 42). Ein Zusammenhang zwischen dem Konsum von Phytoöstrogenen und dem negativen Einfluss auf Risikofaktoren der Krebsentstehung (43-45) oder zumindest einem erhöhten Risiko für das Endometriumkarzinom wird aktuell diskutiert (46-48). Bisher gibt es aus Humanstudien aber nur äußerst wenig Daten zur Wirkung der Phytoöstrogene auf das Endometrium (31, 49-51).

Ziel der Arbeit ist es, die Wirkung von Phytoöstrogenen an hormonabhängigen Zellkulturlinien zu klären. Die am häufigsten untersuchten Phytoöstrogene sind Extrakte aus Soja. Doch sollten in Europa heimische Pflanzen wie Leinsamen ebenfalls in den wissenschaftlichen Fokus rücken. So konzentriert sich diese Arbeit auf den Leinsamen und seine Bestandteile, da dieser bisher nur unzureichend untersucht wurde. Zudem ist der Verzehr von Sojaprodukten in Europa begrenzt, sodass es sinnvoll schien, den hiesigen Leinsamen und dessen Metaboliten für die Untersuchungen auszuwählen. Durch Massenspektrometrie werden die phytohormonellen Inhaltsstoffe des gewonnenen Extrakts gesucht. Im Zellkulturmodell soll überprüft werden, ob die im humanen Endometrium nachgewiesenen Konzentrationen der ausgewählten Lignane messbare Effekte auslösen können und welcher Art diese Effekte sind. Da Phytoöstrogene die Entstehung rezeptorabhängiger Tumoren beeinflussen können, wird in dieser Arbeit untersucht, ob nach Stimulierung von humanen endometrialen Zellen mit einem Leinsamenrohextrakt und verschiedenen industriell hergestellten Lignanen ein proliferativer, hemmender oder gar zytotoxischer Effekt an den Zellen eintritt. Des Weiteren soll die Toxizität Podophyllotoxins als Kontrollwert spezifiziert werden. Der proliferative Effekt soll durch Östradiol belegt werden. Mit den hier durchgeführten Versuchen sollen letztlich im Zellkulturmodell Hormonrezeptor-positiver Endometriumkarzinomzelllinien Dosis-Wirkung-Beziehungen des hier eingesetzten Lignanrohextraktes aus Leinsamen und kommerziell erworbenen Lignanen zur Zytotoxizität und zum Proliferationsverhalten

der Zelllinien korreliert werden. Abschließend wird die Frage einer möglichen Übertragbarkeit der In-vitro-Ergebnisse auf In-vivo-Verhältnisse geklärt.

## **2. Theoretische Grundlagen**

### **2.1. Endogene Östrogene**

#### **2.1.1. Definition**

Neben den Sexualsteroiden Gestagen und Androgen produziert der weibliche Körper endogene Östrogene. Zu den endogenen Östrogenen zählen Östron, 17- $\beta$ -Östradiol und Östriol. Sie sind an zahlreichen physiologischen Stoffwechselprozessen der Frau beteiligt, wie am Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, der Zellproliferation der Brust und der Geschlechtsorgane sowie deren hormonabhängige Steuerung und am Knochenaufbau (52). Die überwiegende Menge stammt aus dem Ovar. Allen und Doisy (1924) haben in ihren Experimenten an den Ovarien weiblicher Ratten gezeigt, dass das Ovar Bildungs- und Wirkungsstätte des wohl wichtigsten weiblichen Follikelhormons ist (53).

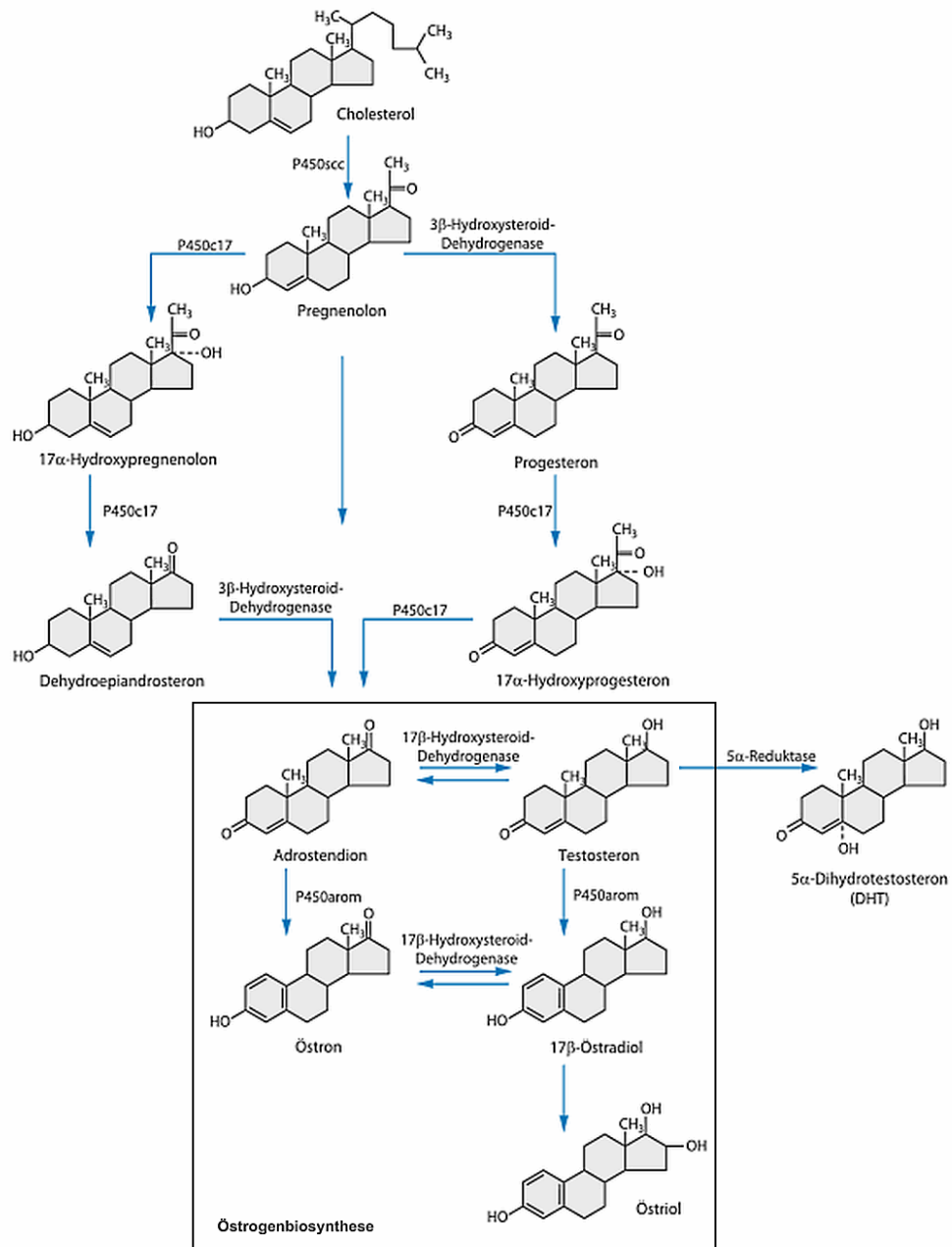
Auch bei Männern wird in nachweisbaren Mengen Östrogen gebildet: Es entsteht durch die Umwandlung von Testosteron mithilfe einer gewebsgebundenen Aromatase, z. B. im Fettgewebe. Das hauptsächlich bei beiden Geschlechtern aktive Östrogen ist das 17- $\beta$ -Östradiol.

#### **2.1.2. Physiologische Wirkung der endogenen Östrogene**

Die physiologischen Wirkungen der Östrogene auf den Menschen sind vielfältig und werden, geschlechtsunabhängig von der Hypophyse gesteuert. Bei der Frau kommt es bspw. neben der Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale zu einem zyklusabhängigen Wachstum des Endometriums. Zusätzlich steigt die Retention von Wasser, die Ansammlung von Aminosäuren und die Proteinbiosynthese wird angeregt (52). Zyklusabhängig liegen die Normwerte zwischen 100–600 pg/ml (367–2200 pM). Während der Schwangerschaft steigt der Östrogenspiegel auf Werte bis 20.000 pg/ml (70.000 pM) und postmenopausal liegt er bei 5–20 pg/ml (18–74 pM) und somit leicht unterhalb der gemessenen Werte bei Männern (54).

### 2.1.3. Struktur und Biosynthese der Östrogene

Für alle Steroidhormone, wie Progesteron oder die Östrogene Östron, 17- $\beta$ -Östradiol und Östriol, ist Cholesterol die Vorstufe.



**Abb. 1 Syntheseweg der steroidalen Sexualhormone**

(Grafik modifiziert nach Leidenberger: Klinische Endokrinologie für Frauenärzte. Springer Verlag, 4. Auflage 2009, S. 25)(52)

Wie in Abb. 1 deutlich wird, sind die Dehydrogenasen und die Cytochrom-P450-Oxidasen sowie Cytochrom-P450-Aromatasen an der endogenen Östrogenbiosynthese beteiligt (52). 17- $\beta$ -Östradiol ist als kleines lipophiles Molekül in der Lage, leicht in die Zellen hinein zu diffundieren. Jedoch wird in Zellen mit Östrogenrezeptoren (ER) das Östrogen gebunden und somit an einer weiteren Diffusion gehindert.

#### **2.1.4. ER und ihre molekularen Wirkmechanismen**

Wie die meisten Proteine im Körper benötigen auch die Östrogene Rezeptoren, um an den Zielorganen zu wirken. Allen Östrogenwirkungen vorrangig ist die unterschiedlich starke Bindung der Östrogene an die im Körper verteilten ER. ER gehören zu den Steroidhormonrezeptoren und sind im Zellkern lokalisiert. Bekannt sind derzeit zwei Typen von ER mit ähnlicher Struktur: ER- $\alpha$  von Green et al. (55) und ER- $\beta$  von Kuiper et al. (56) entdeckt. Die Verteilung der ER unterscheidet sich je nach Geschlecht und Verortung im Körper. So befinden sich ER beim Mann u. a. in den Testes (ER- $\alpha$ ), der Leber (ER- $\alpha$ ), den Nebennieren (ER- $\alpha$ ), den Gefäßen (ER  $\alpha/\beta$ ) und in der Prostata (ER- $\beta$ ). Bei der Frau befinden sich ER u. a. in der Blase, den Knochen, Gehirn und Thymus (ER- $\beta$ ) sowie in den Ovarien, im Uterus und in der Brust (ER- $\alpha/\beta$ )(56-58).

ER bauen sich aus mehreren Domänen auf: der zentralen DBD, der C-terminalen LBD und der N-terminalen Domäne und liegen im Zellkern. Dort sind sie an Chaperone, z. B. an das HSP90, gebunden, wodurch sie inaktiviert werden. Im Blut frei zirkulierendes Östrogen passiert die Zellmembran und bindet als Ligand an den ER. Nach Bindung des Liganden unterliegen ER einer Änderung ihrer Konformation, wodurch sie die Transkription hormonregulierter Gene steuern. Sie haben somit die Funktion von Ligand-aktivierten Transkriptionsfaktoren. Nach Ligandbindung kommt es zu einer Dimerisierung der ER, und die DNA-bindende Domäne der Östrogenrezeptor-Proteine kann schließlich mit hoher Affinität an spezifische DNA-Sequenzen (EREs) der Zielgene andocken und deren Transkription steuern (59). Über diesen „klassischen“ Weg wird die Gentranskription durch beide ER gleichermaßen beeinflusst, die Bindung von Östrogenen führt zur Aktivierung, während die Bindung von Antiöstrogenen zu einer Inhibition der Gentranskription führt.

Es wird vermutet, dass beide ER über einen „nichtklassischen“ Weg mit anderen DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. AP-1, interagieren können, um die Zielgene dann über „Promotor response elements“ (60) zu regulieren. Es ist bekannt, dass auf diesem Weg die Gentranskription anders über den ER- $\alpha$  als über den ER- $\beta$  beeinflusst wird. Unabhängig davon, ob ein Östrogen oder ein Antiöstrogen an den ER- $\alpha$ -AP-1-Komplex bindet, wird die Gentranskription aktiviert. Bei Bindung eines Antiöstrogens an den ER- $\beta$ -AP-1-Komplex wird die Transkription des Zielgens ebenfalls gesteigert, jedoch bei Bindung eines Östrogens an den ER- $\beta$ -AP-1-Komplex wird die Gentranskription gehemmt (60). Als Ursache für die funktionellen Differenzen werden strukturelle Unterschiede der Östrogenrezeptoren gesehen. Unter Östrogeneinfluss können die Rezeptoren auch dahingehend interagieren, dass sich ER- $\alpha$  an den Promotor von ER- $\beta$  bindet und so die Expression des ER- $\beta$  erhöht (61).

#### **2.1.5. ER und die Signaltransduktion bei bestimmten Krebsarten**

Wie bereits in 2.1.4. erwähnt, agieren ER u.a. als Transkriptionsfaktoren, indem sie nach Ligandenbindung die Transkription und Expression hormonregulierter Gene steuern. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aktivierung von ER zu Tumoren der Brust oder des Endometriums führen kann. Bekannte östrogenregulierte Gene und Proteine sind andere Steroidhormonrezeptoren, die Wachstumsfaktoren Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und Insulin like Growth Factor-1 (IGF-1) und deren Rezeptoren, Onkogene, Metastasierungsgene, wie Cathepsin D, oder zellproliferierende Gene des Endometriums. Als Folge dieser vermehrten Zellproliferation in der Brust oder im Uterus kann es zur Ausbildung eines Karzinoms kommen (62-66).

Jedoch belegen andere Studien das östrogenbedingte verminderte Karzinomrisiko. So konnte im Tierversuch mit Ratten gezeigt werden, dass männliche Tiere ein höheres Risiko haben, kolorektale Karzinome zu entwickeln im Vergleich zu weiblichen. Dies wird dem fehlenden Östrogenschutz zugeschrieben (67, 68).

## **2.2. Phytoöstrogene**

Reich an Phytoöstrogenen und am häufigsten untersucht sind Sojaprodukte, das

Hauptnahrungsmittel von Menschen im asiatischen Raum. Leinsamen wurde bei den Untersuchungen bisher vernachlässigt, weist aber einen ähnlich hohen Phytoöstrogenanteil auf und ist vornehmlich in westlichen Breitengraden vertreten.

### **2.2.1. Definition**

Phytoöstrogene sind nichtsteroidale Stoffe pflanzlicher Herkunft, die eine Gruppe von 300 Verbindungen in vielen Pflanzen darstellen und als sekundäre Pflanzenstoffe bezeichnet werden. Strukturell ähneln sie dem Östrogen und zeigen nach dem Verzehr bei Säugern östrogenähnliche Effekte (53, 69).

### **2.2.2. Einteilung, Vorkommen und Struktur der Phytoöstrogene**

Phytoöstrogene lassen sich in folgende Stoffklassen (70) unterteilen:

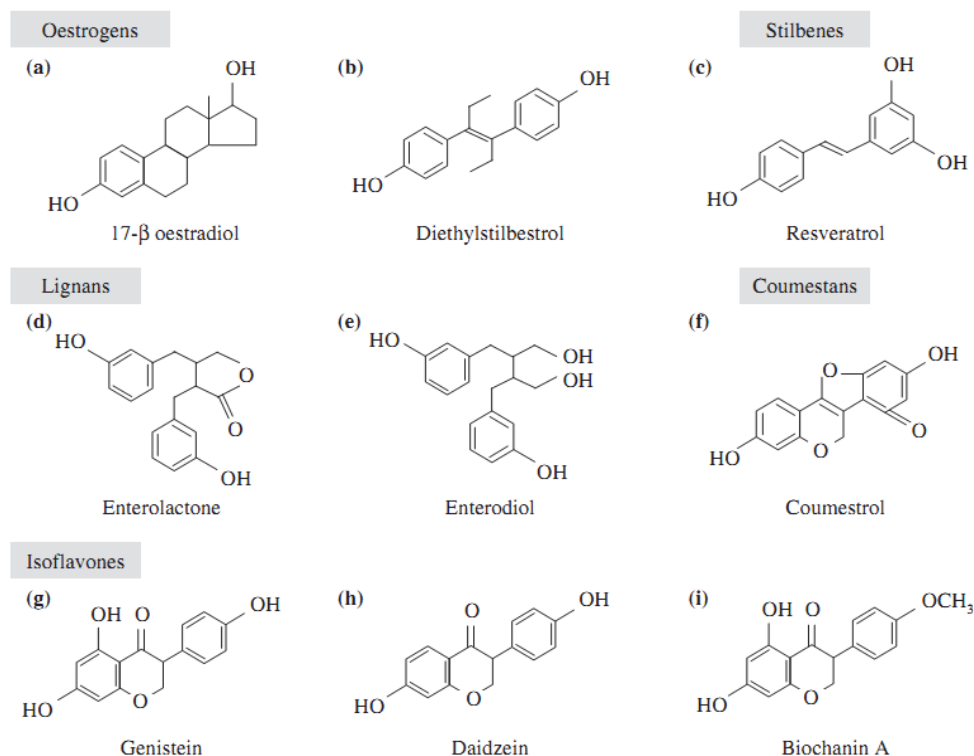
**Lignane:** Secoisolariciresinol, Matairesinol, Enterolacton, Enterodiol

**Isoflavone:** Genistein, Daidzein, Biochanin

**Coumestane:** Coumestrol

**Stilbene:** Resveratrol

Allen gemeinsam ist die phenolische chemische Grundstruktur, die dem Aufbau des menschlichen Hormons 17- $\beta$ -Östradiol ähnelt. Für die spezifische Bindung an ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  ist die Lage der Hydroxylgruppen ausschlaggebend (vgl. Abb. 2) (71).



### Abb. 2 Strukturformeln von endogenen Östrogenen

Limer, Speirs. Phytoestrogens and breast cancer chemoprevention. Breast Cancer Res 2004; 6:119-127 (71)

Phytoöstrogene können an beide Rezeptoren binden mit hauptsächlich antagonistischer Wirkung. Es besteht eine größere Affinität für ER-β als für ER-α (72). ER-β befindet sich hauptsächlich in der Brustdrüse, den Ovarien, dem Uterus, der Prostata und Lunge.

Für die menschliche Ernährung derzeit am bedeutendsten sind die Isoflavone und Lignane. Besonders reich an Isoflavonen sind Sojabohnen und Sojabohnenprodukte, wie Tofu, Miso oder Sojamilch. Lignane finden sich als pflanzliche Sekundärstoffe zumeist in den Zellwänden von Samen, Blüten, Blättern, Rinden und Wurzeln (73). Einen vergleichsweise hohen Lignangehalt weisen Ölsaaten wie Leinsamen auf (74, 75).

### 2.2.3. Bioverfügbarkeit, Metabolismus und Pharmakokinetik der Phytoöstrogene

Phytoöstrogene, im speziellen die Isoflavone und Lignane, kommen vornehmlich in glykosidisch gebundener Form vor und können vom Körper nur mithilfe von Darmbakte-



rien und endogenen Enzymen verwertet werden (76).

Die von den Darmbakterien produzierten sowie die in der Nahrung vielfach vorkommenden  $\beta$ -Glucosidasen spalten die glykosidischen Isoflavone und Lignane in biologisch aktive Aglykone. Aus dem glykosidischen pflanzlichen Genistin, Daidzin und Glycitin, die vorwiegend in Sojaprodukten zu finden sind, werden die biologisch aktiven Isoflavone Genistein, Daidzein und Glycitein. Die pflanzlichen Enterolignanvorstufen Matairesinol und Secoisolairiciresinol werden zu den Aglykonen Enterodiol und Enterolacton. Diese Aglykone können direkt vom Darmepithel aufgenommen oder aber weiter metabolisiert werden. Ein Großteil der aufgenommenen Metaboliten wird in der Leber verstoffwechselt und dem enterohepatischen Kreislauf zugeführt (76, 77). Pharmakokinetisch zeigte sich sowohl für Enterodiol als auch Enterolacton eine nach Nahrungsaufnahme stark verzögerte Nachweisbarkeit dieser Phytoöstrogene im Urin, obgleich sie mikrobiell im Darm produziert, dem enterohepatischen Kreislauf sofort zugeführt wurden und somit dem Körper zeitnah zur Verfügung stehen sollten (76). Während lange Zeit vermutet wurde Secoisolairiciresinol und Matairesinol seien die einzigen pflanzlichen Lignane, fanden Heinonen et al. 2001 noch weitere Enterolignanvorstufen, Lariciresinol und Pinoresinol (78).

#### **2.2.4. Physiologische Wirkung der Phytoöstrogene**

Verschiedene Studien zeigen, dass eine erhöhte Aufnahme von Isoflavonen und Lignan das Risiko verringert, an hormoninduzierten Krebsarten, wie Brust- oder Dickdarmkrebs, zu erkranken (79-82). Der antikarzinogene Effekt von Isoflavonen wurde bei Untersuchungen über die Häufigkeit von Brustkrebs in asiatischen Ländern deutlich. Dabei wurde festgestellt, dass die Krebsrate im asiatischen Raum signifikant niedriger war als in westlichen Ländern (83, 84). Studien weisen den Lignan im Allgemeinen eine verminderte postmenopausale Brustkrebssterblichkeit nach (85, 86).

Es gibt auch Anhaltspunkte, dass Phytoöstrogene wechseljahrestypische Beschwerden, wie Hitzewallungen oder Osteoporose, verringern (36). Ebenso werden Phytoöstrogenen protektive kardiovaskuläre Wirkungen oder eine verbesserte Blutzuckerregulation zugeschrieben (87, 88), zum Teil werden sogar genaue Dosierungen zur täglichen Ein-

nahme wie bspw. 54 mg/d (89) vorgegeben.

#### **2.2.5. Podophyllotoxin**

Bisher nicht erwähnt wurde das Lignan Podophyllotoxin (90). Podophyllotoxin ist ein Gift. Das sogenannte Mitosespindelgift wird im Wurzelstock des immergrünen Podophyllumstrauches gebildet und hemmt die Zellteilung. Die inzwischen vielfach eingesetzten synthetischen Analoga des natürlichen Podophyllotoxins hemmen die DNA-Topoisomerase II und die Zellvermehrung (91).

Podophyllotoxin und seine Analoga besitzen sowohl antivirale als auch zytostatische Eigenschaften. Die durch HPV-Viren induzierten Condylomata acuminata (Feig-, Feucht- oder Genitalwarzen), wie andere Warzenformen auch, lassen sich durch Podophyllotoxin gut behandeln. So wird Podophyllotoxin in der Dermatologie und bei der Behandlung rheumatischer Arthritis erfolgreich eingesetzt. In der Tumorthherapie gehört Podophyllotoxin derzeit zu einem der effektivsten Wirkstoffe. Indikationen für Podophyllotoxinpräparate sind das Ovarial-, Hoden-, Chorion-, Bronchialkarzinom, das Neuroblastom, der Wilms-Tumor, das Ewing-Sarkom, akute Leukämien, das non-Hodgkin- und Hodgkin-Lymphom sowie akute Leukämien (92).

#### **2.2.6. Phytoöstrogene und Hormonersatztherapie**

75 bis 80% der Frauen berichten über menopausale Symptome. Ein Großteil der Befragten empfanden sie als quälend, andere sogar als schwerwiegend.

Viele Jahrzehnte lang wurden Frauen in ihrer postmenopausalen Phase einer Hormonersatztherapie (HRT) unterzogen. Dabei wurde der in der Menopause verminderte Östrogenspiegel durch zusätzliche Östrogengaben ausgeglichen, um die typischen klimakterischen Beschwerden, wie Osteoporose oder Hitzewallungen, zu reduzieren. Epidemiologische Studien lassen zwar Rückschlüsse auf ein verringertes Darmkarzinomrisiko und eine verminderte Osteoporoseaktivität bei postmenopausalen Frauen infolge einer HRT zu, aber die Nebenwirkungen scheinen schwerwiegender als die Symptome des Klimakteriums zu sein. Bspw. bestehen erhöhte Risiken für kardiovaskuläre Erkrankungen und Thrombosen bis hin zur Entstehung von Tumoren (93-97). Daher wird die HRT

gegenwärtig äußerst skeptisch betrachtet (98). Eine Alternative zur klassischen HRT scheinen daher die Phytoöstrogene zu bieten.

#### **2.2.7. Physiologische Wirkungen des Leinsamen**

Leinsamen wird aus der Fruchtkapsel des Flachses (lat. *Linum usitatissimum*) gewonnen (99). Die einjährige Pflanze (Therophyt) gehört zur Gattung der Leingewächse (lat. *Linaceae*) und erreicht eine Wuchshöhe von 20 bis 100 cm.

In wissenschaftlichen und vor allem populärwissenschaftlichen Arbeiten lässt sich ein breites Empfehlungsspektrum finden, wie: „[...] die Anwendung der Leinsamen zumeist bei Störungen des Magen-Darm-Traktes wie bspw. Verstopfung oder Menstruationsbeschwerden sowie bei Beschwerden während der Wechseljahre. Weitere Anwendungsgebiete sind bei Entzündungen oder Geschwüren der Haut als Wickel und bei Sodbrennen, Übelkeit, Brechreiz, Reizdarm und Magenschmerzen Einnahme. Bei Menstruationsbeschwerden verspricht die Anwendung von Leinsamen schnelle Hilfe. „Füllen Sie dazu einfach ein Leinensäckchen mit Leinsamen, lassen Sie es für 10 Minuten im Wasser sieden und legen Sie das Säckchen danach so warm wie möglich abgedeckt mit einem Wolltuch auf den Bauch. Dieses Vorgehen sollten Sie nach einer halben Stunde wiederholen.“ (100)

#### **2.3. SERM-selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren**

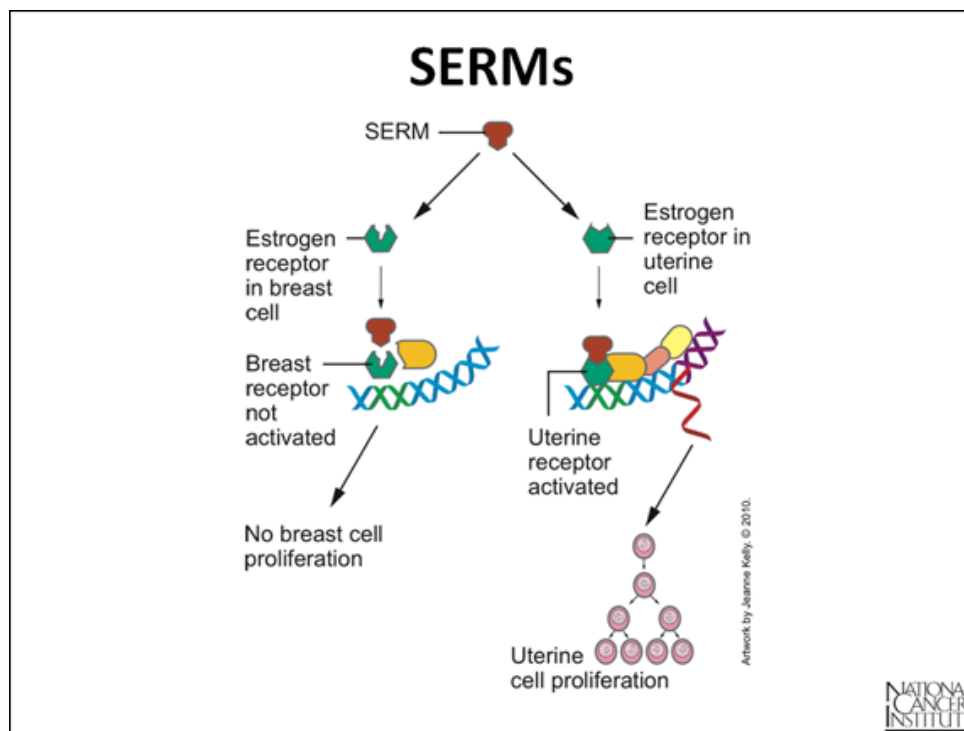
Obgleich Phytoöstrogene mit dem weiblichen Sexualhormon 17- $\beta$ -Östradiol strukturell verwandt sind, besitzen Erstgenannte zusätzlich antiöstrogene Effekte. Phytoöstrogene binden selektiv und mit unterschiedlich starker Affinität an ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ . Deshalb werden Phytoöstrogene auch als selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM) bezeichnet (101).

Der antiöstrogene Effekt der Phytoöstrogene beruht auf einer Hemmung der Östrogensynthetase (Cytochrom-P450-Aromatase) (102), die die Konversion der körpereigenen Androgene (Testosteron, Androstendion) in die Östrogene Östron, 17- $\beta$ -Östradiol und Östriol katalysiert. Dadurch sinkt der freie Östrogenspiegel im Gewebe, die Aktivierung der ER durch freies Östrogen wird reduziert.

So binden sich Isoflavone bevorzugt an ER- $\beta$ , aber mit einer wesentlich verminderten

Affinität als bspw. Vertreter der Stilbene wie das Diethylstilbestrol. Die Lignane zeigen sowohl agonistische als auch antagonistische ER-Aktivitäten (103).

Neben den Phytoöstrogenen existieren synthetische SERM-Präparate, welche bei der Behandlung von Brustkrebs eingesetzt werden, z.B. Tamoxifen. Tamoxifen, wie andere SERM auch, besitzen antagonistische Wirkungen an den ER der Brust und wirken somit hemmend auf die Zellproliferation. In den Knochen, der Leber oder im Endometrium hingegen werden agonistische Östrogeneffekte ausgelöst, die mitunter unerwünscht sind. Hierzu zählt die SERM-induzierte Zellproliferation endometrialer Krebszellen (104-106). Die Ursache für die unterschiedlichen Effekte der SERM auf die ER liegen in den gewebsspezifisch leicht veränderten chemischen Strukturen der Rezeptoren, die eine Bindung der Östrogene ermöglichen oder aber verhindern (vgl. Abb. 3).



**Abb. 3 SERM-Aktivität auf ER in unterschiedlichen Geweben**

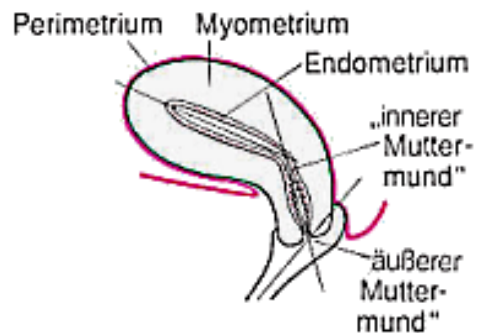
(National Cancer Institute and Substance Abuse at the National Institutes of Health. (66)

## 2.4. Endometrium

Der Uterus ist ein muskuläres Hohlorgan, welches nach innen von einer Schleimhaut überzogen ist, der Tunica mucosa, dem Endometrium. Die zentrale dickere Muskelschicht des Uterus, die Tunica muscularis, das Myometrium, ist nach außen hin durch die Tunica serosa, das Perimetrium, abgegrenzt (vgl. Abb. 4).

Im Verlauf des Menstruationszyklus unterliegt das Endometrium zahlreichen Proliferationsstadien, um den Uterus auf die Einnistung einer Zygote vorzubereiten. Gesteuert durch die Hypophyse gibt das Endometrium Östrogene, z.B. Östradiol, und Gestagene, z.B. Progesteron, während dieses Zyklus ab.

Östrogene induzieren die Proliferation des Bindegewebes und der Oberflächenepithelien (Proliferationsphase) im Uterus. Die Gestagene steigern die Produktion zahlreicher Drüsenzellen, was schließlich zu einer verhältnismäßig enormen Größenzunahme des Endometriums führt (Sekretionsphase) (1).



**Abb. 4 Schichten des Uterus**

(Grafik entnommen aus T. Schiebler, H. Korf: Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie, Steinkopff Verlag, 10. Aufl., 2007, S. 428.)(1)

### 2.4.1. Die Wirkung von Östrogenen am Uterus

Bereits in 2.1.3. und 2.4. wurde auf die vielfältigen physiologischen Wirkungen der Östrogene eingegangen. Insbesondere steuern Östrogene im Uterus die Zellproliferation. In jedem Zellzyklus können kleine Mutationen in der DNA entstehen. So kommt es in den hormonabhängigen Zyklen einer Frau, die bisweilen mehr als 40 Jahre andauern, nicht nur zu einer Zellvermehrung gesunder Zellen, sondern ebenfalls zu einer Replikation bereits mutierter Zellen. Infolgedessen bilden sich verstärkt uterine Tumoren wie das Endometriumkarzinom (107).

#### **2.4.2. Endometriumkarzinom: Entstehung, Inzidenz, Pathogenese und zugrunde liegende Risikofaktoren**

Hormonabhängige Tumoren wie das Endometriumkarzinom mit weltweit 142.000 Neuerkrankungen p.a. (108) gehören zu den häufigsten Tumorerkrankungen, weltweit an siebter Stelle, wobei Nordamerika und Westeuropa mit einer altersstandardisierten Inzidenz zwischen 9,9 und 15 pro 100.000 Frauen p. a. (109, 110) an der Spitze stehen. Die Inzidenz des Endometriumkarzinoms ist in den westeuropäischen Regionen hoch: in Deutschland und der Schweiz ca. 24–25 pro 100.000 Frauen p. a. Am höchsten aber ist die Inzidenz in Nordamerika, hingegen niedrig in Süd- und Ostasien sowie den meisten afrikanischen Ländern. Laut der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie ist es in Deutschland mit etwa 11.300 Neuerkrankungen p.a. das vierthäufigste Malignom der Frau (111, 112). Besonders in der postmenopausalen Phase der Frau ist das Erkrankungsrisiko mit 75% am höchsten (52, 113). Da sich dieser Tumor frühzeitig durch Blutungen bemerkbar macht, ist eine Diagnose bereits im frühen Krebsstadium möglich, sodass die relative 5-Jahres-Überlebensrate mit einem invasiven Zervixkarzinom bei 69% (114) liegt.

Man unterscheidet derzeit zwei Typen von Endometriumkarzinomen: den östrogenabhängigen Karzinomtyp (Typ 1) und den östrogenunabhängigen Karzinomtyp (Typ 2), welcher sich in weitere Subtypen unterteilen lässt (1). Während die Ursachen des Endometriumkarzinoms vom Typ 2 eher unspezifisch sind, existieren für den Typ 1 eine ganze Reihe endo- und exogener Risikofaktoren. Den größten Risikofaktor bei der Entstehung endometrialer Karzinome stellt das Östrogen dar, steuert es doch bereits während des Menstruationszyklus die Zellproliferation des Endometriums. Unbestritten steigt zeit- und dosisabhängig bei alleiniger Östrogentherapie das Risiko, an einem Endometriumkarzinom zu erkranken. Die Anzahl der Neuerkrankungen ist jedoch seit Ende der 1970er-Jahre rückläufig, was u.a. an der seitdem eingesetzten kombinierten Östrogen-Gestagen-Therapie liegt (52). Aufgrund der geringeren Inzidenz für Endometriumkarzinome in asiatischen Ländern kommt hier womöglich der zusätzlich antiöstrogene Effekt der Phytoöstrogene zum Tragen (50).

### **2.4.3. Bekannte Wirkung von Phytoöstrogenen am Uterus**

Phytoöstrogene sind SERM und besitzen sowohl antiöstrogene als auch östrogene Effekte. Es gibt Hinweise, dass die Phytoöstrogene, insbesondere die Lignane, einen protektiven Effekt auf das Endometrium haben. Der antikarzinogene Effekt der Phytoöstrogene auf das Endometrium scheint im Vergleich mit allen Frauen bei postmenopausalen Frauen ausgeprägter zu sein, wofür vermutlich der antiöstrogene Effekt der Phytoöstrogene verantwortlich ist (50). Durch die kompetitive Hemmung des Östrogenrezeptors sinkt die Östrogenrezeptor-induzierte Expression proliferierender Tumorzellen, wodurch es zu einer geringeren Inzidenz von Endometriumkarzinomen kommt (65).

Bandera et al. stellten jedoch im Kontext mit zahlreichen anderen Studien fest, dass die protektiven Wirkungen der Phytoöstrogene auf die Entstehung von Endometriumkarzinomen noch nicht eindeutig sind (115). Auch in mehreren tierexperimentellen Studien konnten proliferative Effekte auf den Uterus gezeigt werden (116-119). Eine 5-jährige doppelblinde, Placebo-kontrollierte Studie in Frankreich mit über 300 Frauen zeigte, dass Phytoöstrogene mit einem Anstieg in der Inzidenz (3,8% gegenüber 0%) von Endometrium-Hyperplasien assoziiert sind (120).

## **3. Material und Methoden**

Nachfolgend wird der Verlauf der Untersuchung dargestellt.

- Um aus dem einheimischen Leinsamen Phytoöstrogene zu extrahieren, wurde eine Versuchsanleitung in Kooperation mit dem Fachbereich Biowissenschaften und dem Fachbereich Chemie der Universität Rostock erarbeitet.
- In Zusammenarbeit mit dem Fachbereich Chemie der Universität Rostock wurde eine chemische Analyse der wirksamen Extrakte bezüglich phytohormoneller Inhaltsstoffe mittels Massenspektrometrie durchgeführt.
- Die verwendeten Zellkulturen wurden immunozytochemisch charakterisiert.
- Das gewonnene Extrakt und die industriell erworbenen Lignane wurden in zwei verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen an den Hormonrezeptor-positiven Endometriumkarzinomzelllinien getestet:

1. mittels Bestimmung der Zellproliferation im MTT-Test
2. mittels Bestimmung der Zellproliferation im BrdU-Test.

### **3.1. Materialien**

#### **3.1.1. Laborgeräte und Software**

Brutschrank: CO<sub>2</sub> begast Heraeus, Osterode, Deutschland

Computersystem zur Extinktionsmessung: ELISA- Reader SLT Labinstruments GmbH, Crailsheim, Deutschland

Immulite-Analysesystem: DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland

Kühl- und Gefrierschränke: (-80°C) Heraeus, Osterode, Deutschland

Laborzentrifuge: Universal 30 RF Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

Magnetrührer: Magnetrotationsgerät Typ MR 2002 Heidolph

Massenspektrometer: LC-MS-System LCQ- Advantage (Thermo-Finnigan)

Phasenkontrastmikroskop: mit Kamera CK 2, Tokyo, Japan

Präzisionswaage: Typ BP 210 S Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Sterilbox: Heraeus, Osterode, Deutschland

Vakuumrotationsverdampfer: eppendorf concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Vortex-Laborschüttler: Typ REAX 2000, Heidolph, München, Deutschland

Wärmeschränk: Heraeus, Osterode, Deutschland

#### **3.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

96er-Mikrotiterplatten: (MTP) 96-Wellplates Cellwells™, CORNING®, Corning US

Aktivkohle: Charcoal activated Norit®, SIGMA®Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Antibiotic Antimycotic: (10.000IE. Penicillin/ml, 10mg Streptomycin und 25µg Amphotericin B per ml), Produkt No. A9909,5ml, SIGMA®Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

DAB Diaminobenzidin: DAKO Hamburg, Deutschland

Dextran 70: Linear Formula:(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>, SIGMA® Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf-



kirchen, Deutschland

Dimethyl Sulfoxide Sigma®:(Methyl Sulfoxide; DMSO), DMSO, rein G. Vogler b.v. Rotterdam, Niederlande

DMEM: Dulbeccos's Modified Eagle's Medium Produkt No. D5648, 500ml, - high glucose - with 4500 mg/l glucose and L-glutamine, without sodium bicarbonate, powder, suitable for cell culture, SIGMA® Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Dulbeccos Phosphate Buffered Saline: (PBS), ohne Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, seromed®, Cat.No. L 1823, Lot No. 564 U, Biochrom KG, Berlin, Deutschland

Einwegsterilfilter: Produkt No. 58067, Nylon 66 Filter Membranes, pore size 0.45µm, diam. 47mm, pkg of 50, SIGMA® Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Einwegsterilfilter: Produkt No. 58188, Cellulose Filter Membrane, pore size 0.22µm, diam. 47mm, pkg of 100, SIGMA® Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Fetales Kälberserum:(FKS, Fetal Bovine Serum, FBS) SIGMA® Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Hydrogen Peroxide: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Pufferlösung 100ml, Produktnummer 386790, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

L-Glutamin: 200mM SIGMA® Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

MEM: Minimum Essential Medium Eagle, Produkt No. M3024, 500ml, with Earle's salts and non-essential amino acids, without L-glutamine, phenol red and sodium bicarbonate, modified, powder, suitable for cell culture SIGMA® Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Pipetten mit Spitzen: 10ml, 5ml Greiner BIO-ONE, Frickenhausen, Deutschland

Pipettierhilfe PhysioCare concept, verschiedene Volumina, Eppendorf Research

Sterilfilter: 500 ml Filtersystem, CORNING®, Corning, US

Teflonbeschichtete Dreiloch-Objektträger: Ø der Vertiefungen 14mm, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Trypanblaulösung: Trypanblau (0,4%), SIGMA® Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkir-

chen, Deutschland

Trypsinlösung: Trypsin- EDTA solution, 1x, cell culture tested, SIGMA® Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Tubes: 2ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

V5007 Nalgene® cryogenic vials: size 2.0 ml, sterile SIGMA® Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Zellkulturflaschen: NUNCLON™ NUNC™, Nalge Nunc International, Zellkulturflaschen mit Oberflächen von 25–175cm<sup>2</sup>, Roskilde, Dänemark

### **3.1.3. Testsysteme**

BrdU-Test: BrdU-Labeling and Detection Kit III, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

MTT-Test: Cell Proliferation Kit I (MTT), Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland

Vectastain-Elite-ABC-Kit: Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK

### **3.1.4. Zelllinien**

Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa: ECACC Salisbury, Wiltshire, UK

Endometriumkarzinomzelllinie MFE-280: ECACC Salisbury, Wiltshire, UK

Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, US und dem europäischen Vertriebspartner LGC Standards, Teddington, UK

### **3.1.5. Leinsamen, Lignane und 17-β-Östradiol**

Leinsamen: 100gr, Linum usitatissimum der Sorte Barbara, Bestand der Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abteilung Biochemie

Matairesinol: 25mg, Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>, Family: Lignans, CAS#: 580-72-3, Extracted From: Flax, M 358,39g/mol, Chromadex, Santa Ana, US

Enterodiol: 25mg, Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>, Family: Lignans, CAS#: 80226-00-2, Extracted From: Flax, M 302,36g/mol, Chromadex, Santa Ana, US

Enterolactone: 25mg, Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>, Family: Lignans, CAS#: 78473-71-9, Extracted From: Flax, M 298,33g/mol, Chromadex, Santa Ana, US

Secoisolariciresinol: 2 mg, Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>, Family: Lignans, CAS#: 580-72-3, Extracted From: Flax, M 362, 42 g/mol, Chromadex, Santa Ana, US

Podophyllotoxin: 5mg, Chemical Formula: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>, Family: Lignans, Toxins, CAS#: 518-28-5, Extracted From: NA, M 414,411g/mol, Chromadex, Santa Ana, US

17-β-Östradiol: 25mg, β-Estradiol-Water Soluble, E4389, Synonym: Cyclodextrin-encapsulated 17β-estradiol, M 272,38g/mol, SIGMA® Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

### **3.2. Nährmedien und Lösungen**

In diesem Kapitel werden die wichtigsten Nährmedien und Lösungen, die für die Untersuchungen zubereitet werden mussten, benannt.

#### **3.2.1. Zusammensetzung der Zellkulturmedien und -lösungen**

##### **3.2.1.1. Einfriermedium**

Das Medium besteht aus 10% FKS, 70% DMEM-Medium und 20% DMSO.

##### **3.2.1.2. PBS (Phosphate buffered saline)**

Mithilfe von PBS wird in zellbiologischen Experimenten die Osmolarität der Zellen aufrechterhalten. Phosphatgepufferte NaCl-Lösung, bestehend aus 8g Natriumchlorid (NaCl), 0,2g Kaliumchlorid (KCl), 0,2g Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) und 2,9g Dinatriumphosphatdihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), wurde in 1l Aqua dest. aufgelöst mit NaOH/HCl auf einen pH-Wert von 7,2–7,4 (das Optimum lag bei 7,35) eingestellt. Dies entspricht der isotonischen Konzentration im menschlichen Körper.

##### **3.2.1.3. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)**

Es wurde DMEM Produkt No. D-5648 von der Firma Sigma verwendet.

Zur Herstellung von 1000ml Medium wurde 1000ml Aqua dest. versetzt mit:

- 13,36g Pulver DMEM
- 3,0g Natriumhydrogencarbonat

- 5,2g Hepes Puffer (1M)

Dann erfolgte die Sterilfiltration des Mediums mit einem Filter der Porengröße 0,2µm. Mit NaOH/HCl wurde es auf einen pH-Wert von 7,2–7,4 (das Optimum lag bei 7,35) eingestellt. Folgendes wurde hinzugegeben:

- Antibiotic/Antimycotic, bestehend aus 10.000 IE Penicillin/ml, 10mg Streptomycin und 25µg Amphotericin B per ml
- Feta-Bovine-Serum, 50ml, um die Kulturen mit Proteinen, Aminosäuren, Spurenelementen und Hormonen zu versorgen.

Das Medium wurde bis zum Verbrauch bei 9°C gelagert.

#### **3.2.1.4. MEM (Minimum Essential Medium Eagle)**

Es wurde MEM Produkt No. M3024 von der Firma Sigma verwendet.

Zur Herstellung von 1000ml Medium wurde 1000ml Aqua dest. versetzt mit:

- 13,36g Pulver DMEM
- 3,0g Natriumhydrogencarbonat
- 5,0 g Hepes Puffer (1M)

Dann wurde das Medium sterilfiltriert mit einem Filter der Porengröße 0,2µm und mit NaOH/HCl auf einen pH-Wert von 7,2–7,4 (das Optimum lag bei 7,35) eingestellt. Des Weiteren wurde Folgendes zugegeben:

- Antibiotic/Antimycotic (10.000 IE Penicillin/ml, 10mg Streptomycin und 25µg Amphotericin B per ml),
- Gestripptes Feta-Bovine-Serum, 50ml

Das Medium wurde bis zum Verbrauch bei 9°C gelagert.

#### **3.2.2. Strippen des Feta-Bovine-Serums**

Ziel des Strippens ist es, alle Steroidhormone einschließlich des 17-β-Östradiols zu entfernen. Dafür wurde die Methode nach Soto et al. (121) angewandt. Zuerst wird die Aktivkohle zweimal mit je 45ml Wasser resuspendiert und 5 Minuten bei 1200 U/min abzentrifugiert. 40ml des langsam, bei ca. 9°C aufgetauten FBS wurde daraufhin mit 2,2g säuregewaschener Aktivkohle und 0,22g Dextran versetzt. Anschließend wurde die Mischung eine Stunde bei 37°C mit dem Magnetrührer inkubiert. Die Suspension wurde

danach 40 Minuten bei 3200 U/min zentrifugiert. Mit einer Pipette wurde das gestrippte Serum (CD-FCS) abgenommen, steril zunächst durch einen 0,45µm und anschließend durch einen 0,22µm Einwegfilter filtriert und in Aliquote zu je 50ml abgefüllt. Das CD-FCS wurde sofort verwendet oder für den weiteren Gebrauch bei -30°C eingefroren.

### **3.3. Methoden**

#### **3.3.1. Die getesteten Substanzen**

##### **3.3.1.1. Gewinnung des Leinsamenrohextraktes**

Zusammen mit dem Fachbereich Chemie der Universität Rostock isolierten wir nach der von Herrn Dr. rer. nat. W. Ruth (122) entwickelten Methode, Kaltextraktion mit Methanol, aus Leinsamen den Leinsamenrohextrakt, der Grundlage für unsere Untersuchungen an den Zellkulturen bildete. Diese Kaltextraktion ist eine für die Rohextraktgewinnung sehr schonende Methode, um die darin enthaltenen Stoffe zu bewahren.

Dazu wurden 100g Leinsamen zusammen mit Trockeneis in einer elektrischen Mühle gemahlen. Der durch Kryozerkleinerung gewonnene pulverförmige Leinsamen wurde auf 5 Röhrchen verteilt. Ca. 1 g des Leinsamenrohextraktes wurde in 100µl Methanol gelöst und für die geplante HPLC-MS-Analyse bereitgestellt. Den übrigen Rohextrakten wurden je 20ml Methanol zugefügt. Es wurde anschließend jeweils eine halbe Stunde im Schüttler bei 300 Bewegungen pro Minute vermengt. Anschließend wurde das Methanol vorsichtig mit der Pipette in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Jedes Röhrchen wurde nun mit je 30ml Methanol versetzt und erneut für eine halbe Stunde bei 300 Bewegungen pro Minute im Schüttler durchmischt. Das Methanol wurde erneut in den Erlenmeyerkolben abpipettiert. Dadurch waren die Stoffe des Leinsamenrohextraktes in Methanol aufgenommen und konnten anschließend im Rotationsverdampfer bei 50°C, 90 Umdrehungen pro Minute und einem Vakuum von 250mbar bis zur Trocknung eingengt werden. Als verbliebenes Destillat erhielten wir 624mg Leinsamenrohextrakt in fester Form. Der bis zur Trocknung eingengte Rohextrakt wurde mechanisch aus dem Kolben gelöst und anschließend in 10 annähernd gleichen Teilen von 49mg bis 72mg in

2 ml-Tubes gefüllt.

#### **3.3.1.2. Phytoöstrogene und Kontrollen**

Gleichzeitig erwarben wir zur Testung die synthetisch hergestellten Lignane Matairesinol, Secoisolariciresinol, Enterodiol und Enterolacton. Als Referenzgruppen dienten jeweils die unstimulierte DMSO-Leerkontrolle der Endometriumkarzinomzellen sowie als Positivkontrolle 17- $\beta$ -Östradiol. Das ebenfalls synthetisch hergestellte Podophyllotoxin wurde als Kontrollstoff bezüglich einer möglichen Zytotoxizität verwendet.

#### **3.3.2. Löslichkeitsversuche und Lösungsmiteleinfluss bei den verwendeten Zelllinien**

Für alle verwendeten Substanzen musste ein geeignetes Lösungsmittel als Lösungsvermittler eingesetzt werden, welches einerseits maximal verträglich mit der Zellkultur war und gleichzeitig eine minimaler toxische Wirkung auf die Zellkulturen hatte. Dazu wurden DMSO 1 %, DMSO 0,4 %, DMSO 0,1 %, DMEM und PBS getestet. Daraufhin wurde der Lösungsmiteleinfluss an den verwendeten Zelllinien überprüft. Dazu wurden nur diejenigen Lösungsmittel getestet, die eine gute Löslichkeit nachwiesen. Um einer Instabilität der Lösungen und dem damit einhergehenden Wirkungsverlust entgegenzuwirken, wurden regelmäßig frische Lösungen hergestellt.

##### **3.3.2.1. Löslichkeitsversuche mit DMSO**

Je eine Probe wurde in 1 ml DMSO in den Konzentrationen DMSO 1 %, DMSO 0,4 %, DMSO 0,1 % gelöst, um sie daraufhin für 15 Minuten in den Laborschüttler zu geben.

##### **3.3.2.2. Löslichkeitsversuche mit DMEM**

Eine Probe wurde primär in 1 ml DMEM gelöst, dann wurden zusätzlich 44 ml DMEM dazugegeben, um die gesamte Flüssigkeit daraufhin im Magnetrührer für 30 Minuten zu durchmischen.

##### **3.2.2.3. Löslichkeitsversuche mit PBS**

Eine weitere Probe wurde in 1 ml PBS gelöst und dann 44 ml PBS hinzugegeben. Die Mischung wurde daraufhin im Magnetrührer für 30 Minuten vermengt.

### **3.3.3. Chemische Analytik**

#### **3.3.3.1. Strukturanalyse des Leinsamenrohextraktes mittels HPLC-MS**

Die Strukturanalyse des Leinsamenrohextraktes erfolgte mittels HPLC-MS in Zusammenarbeit mit dem Fachbereich Chemie der Universität Rostock (122).

HPLC-MS ist die Kopplung des Verfahrens Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography) mit der Massenspektrometrie (MS). Dabei dient die Chromatographie zur Auftrennung und die MS (123) zur Identifikation und Quantifizierung, mit ihr lässt sich die Konzentration der Substanzen ermitteln.

Will man mithilfe chromatographischer Verfahren die Trennung eines Substanzgemisches erreichen, nutzt man die unterschiedliche Verteilung der zu trennenden Stoffe auf zwei nicht miteinander mischbaren Phasen. In der Chromatographie (124, 125) wird die Substanz von einer mobilen auf eine stationäre Phase transportiert, wobei ein unterschiedlich schneller Weitertransport aufgrund der spezifischen physikochemischen Eigenschaften jeder Substanz erfolgt. Wird die Retentionszeit der unbekannten Substanz mit der einer Standardsubstanz verglichen, kann dies zur Trennung und somit auch zur Identifikation der einzelnen Komponenten des Analyten herangezogen werden.

Das zu untersuchende Stoffgemisch wird in die Gasphase überführt und ionisiert. Die Elektrosprayionisation (ESI) (126-129) ist eine Technik, bei welcher die Ionen für das zu analysierende Molekül schonend erzeugt werden und zu einem sehr geringen Fragmentationsanteil führen. Sie stellt somit ein geeignetes Analysewerkzeug für phenolische Verbindungen dar. Die Ionisation der vorhandenen Verbindungen erfolgt im Ionisator im Hochspannungsfeld bei +5 kV im ESI-Modus. Die Analytlösung wird bei 150°C über eine Transferkapillare, die als Ionenfalle dient, gelenkt. Dort erfolgt eine Sortierung nach dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. Am leichtesten wird dabei das Strukturelement mit der niedrigsten Bindungsaktivität abgespalten. Die Polarität wird über die Retentionszeiten abgeleitet. Im Computerregistriersystem des Massenspektrometers erfolgt eine Identifizierung durch eine Korrelation der Molaren Masse der Strukturele-

mente mit der Molaren Masse bekannter Strukturen.

Durch Umstrukturierungen und die Einführung neuer Computersysteme am Fachbereich Chemie der Universität Rostock gingen die gewonnenen Daten aus der HPLC-MS des Leinsamenrohextraktes vollständig verloren. Sie waren nicht mehr eruierbar. Da eine erneute Analyse des Leinsamenrohextraktes mit hohem finanziellem als auch zeitlichem Aufwand verbunden ist, war das genutzte Verfahren nicht wiederholbar. Neuerliche Untersuchungen würden zudem keine validen Untersuchungsergebnisse liefern, da Leinsamen als natürliches Produkt fortschreitenden Veränderungsprozessen unterliegt. Doch bereits in vorangegangenen Arbeiten unserer Forschungsgruppe wurde eine Strukturanalyse des Leinsamenrohextraktes mittels HPLC-MS durchgeführt, sodass auf diese Analyseergebnisse zurückgegriffen werden konnte (130). Die Übertragbarkeit der bestehenden Daten ist gewährleistet, da es sich bei dem in unserer Arbeit verwendeten Leinsamen, Sorte Barbara aus der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt MV, Rostock, zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. S. Abarzua (131), um den gleichen Samen handelt, der auch in den bisherigen Untersuchungen unserer Laborgruppe verwendet wurde.

Für die Analyse wurde eine C18-Säule (Discovery, Supelco) mit einer Flussrate der mobilen Phase von 0,2 ml pro min verwendet. Der Leinsamenrohextrakt wurde in 50 µl Methanol gelöst. Es wurde 2 µl Material auf die Säule gegeben, die dann durch einen Stufengradienten aus Methanol und 6 % Essigsäure separiert und durch Messung der positiven und negativen Ionen im ESI-Modus zwischen 80–2000 amu identifiziert wurde (130). Zur Korrelation in der Massenspektrometrie werden die Molaren Massen bekannter Phytoöstrogene genutzt (vgl. Tab. 1), indem die Peak-Flächen der Standards mit der Peak-Fläche des Analyten verglichen werden. Die gesuchte Massenspur wird computergesteuert erkannt. Aus finanziellen Gründen konnte die Quantifizierung der gefundenen Extraktbestandteile in unserer Forschungsgruppe nicht durchgeführt werden (130). Es erfordert Referenzstandards mit einer Reinheit von 99,99 %, um eine validierte Kalibrierungskurve zu erstellen, sodass die HPLC-MS in diesem Fall nur den qualitativen Nachweis der Inhaltsstoffe lieferte.



**Tab. 1 Molare Massen der Isoflavone und Lignane des Leinsamenrohextraktes**

Aufgelistet sind die Molaren Massen der Isoflavone und Lignane, die in dem untersuchten Extrakt detektiert wurden, in g/mol. Es wurden sowohl die Aglycone und Dimere als auch die glycosidisch gebundenen Phytoöstrogene mittels HPLC-MS identifiziert.

Verbindung	Molare Masse	Dimer	Addukt	Glycosid	Diglycosid	Glycosid-Dimer
Genistein	270,2	540,4	330,2	432,4	594,6	864,8
Daidzein	254,2	508,4	314,2	416,4	578,6	832,8
Formononetin	268,2	536,4	328,2	430,4	592,6	860,8
Boichanin A	284,2	568,4	344,4	446,4	608,6	892,8
Coumestrol	268,2	536,4	328,2	430,4	592,6	860,8
Secoisolariciresinol	362,4	724,8	422,4	524,6	686,8	1049,2
Matairesinol	358,39	716,8	418,4	520,6	682,8	1041,2
Enterodiol	302,3	604,6	362,3	464,5	627,7	929
Enterolacton	298,3	596,6	358,3	460,5	622,7	921
Pinoresinol	374,43	748,8	434,4	536,6	698,8	1073,2
Isolariciresinol	360,4	722,8	420,4	522,6	684,8	1045,2
Arctigenin	372,4	744,8	432,4	534,6	696,8	1069,2
Lariciresinol	360,4	720,8	420,4	522,6	684,8	1045,2

### 3.3.3.2. Immunzytochemische Charakterisierung der verwendeten Zellkulturen zum Nachweis des Progesteron, ER- $\alpha$ und ER- $\beta$

Die Bestimmung des Rezeptorstatus der verwendeten Endometriumkarzinomzelllinien wurde mithilfe des Vectastain-Elite-ABC-Kits durchgeführt. Die Lösungen wurden nach Herstellerangaben hergestellt.

Nach 96 Stunden Kultivierung der Zellen werden sie in DMEM aufgenommen. Je 200  $\mu$ l Zellsuspension werden mit je  $1 \times 10^4$  Zellen in die dafür vorgesehenen, teflonbeschichteten, sterilisierten Objektträger mit je drei Wells pro Objektträger ausgesät. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in einer sterilen feuchten Kammer (Petrischale) in den Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 Stunden gestellt. Die Kontrolle der Konfluenz erfolgte lichtmikroskopisch. Die Zellen wurden daraufhin dekantiert, für 12 Stunden luftge-

trocknet. Die Fixierung erfolgte für 10 Minuten in 4%igem Phosphat-gepuffertem Formaldehyd. Zu Beginn des immunhistochemischen Nachweises wurden die Schnitte zunächst bei Raumtemperatur dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen, dann folgte die Blockierung unspezifischer Hintergrundreaktionen durch Zugabe von Normal-Pferde-Serum. Eine Inkubationszeit von 20 Minuten schloss sich an. Der Überstand wurde erneut dekantiert, wobei darauf zu achten war, dass die Objektträger nicht austrockneten. Danach folgte zur Lokalisation der ER- $\beta$  und ER- $\alpha$  die Inkubation mit je 150  $\mu$ l der in PBS gelösten primären Antikörper jeweils 1:10 verdünnt. Der Leerwert mit PBS diente zur Kontrolle. Anschließend wurden die Schnitte abgedeckt und über Nacht bei 4 °C in Blocklösung mit dem Primärantikörper inkubiert.

Nach dreimaligem jeweils fünfminütigem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit dem biotinyliertem Zweitantikörper (5 ml PBS+ 2 Tropfen Reagent A+ 2 Tropfen Reagent B) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen. Hierauf folgte die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Reagens, erneut drei Waschschrte mit PBS und eine weitere 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und dem Peroxidase-Substrat 3,3'-Diaminobenzidin startete die Färbereaktion. Sobald die Schnitte eine deutliche Färbung zeigten, wurden sie jeweils fünf Minuten in Leitungswasser gewaschen, um die Farbreaktion abubrechen. Sämtliche Arbeiten wurden mit Handschuhen und unter einer chemischen Abzugshaube durchgeführt. Als nächstes erfolgte die Gegenfärbung mit der mikroskopischen Färbemethode Häkalaun nach Mayer. Dafür wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült, die Häkalaun Gebrauchslösung für 5-10 min aufgetragen, bis die Kerne gut gefärbt waren und mikroskopisch kontrolliert werden können. Die überschüssige Farblösung wurde vom Objektträger entfernt und mit Aqua dest. gespült, bis das ablaufende Wasser farblos war. Unter fließendem Leitungswasser wurde der Träger zusätzlich ausgewaschen (Bläuen) und mikroskopisch kontrolliert. Als die farbliche Differenzierung das gewünschte Ausmaß erreicht hatte, wurde der Objektträger sofort mit aufsteigender Alkoholreihe dehydriert, weshalb die Proben jeweils für einige Sekunden in 50 %, 70 % und 100 % Ethanol gespült wurden. Die Objektträger wurden mit Xylol dreimal für fünf Minutengeschpült und über Nacht luftgetrocknet. Als

letzter Schritt erfolgte das Eindecken mit Kanadabalsam mit je einem Tropfen pro Well.

Die Präparate wurden erneut unter dem Lichtmikroskop beurteilt, dabei galt:

- braune Reaktion  $\approx$  DAB-Reaktion = positive Reaktion
- blaue Reaktion  $\approx$  Hämalaunfärbung = negative Reaktion

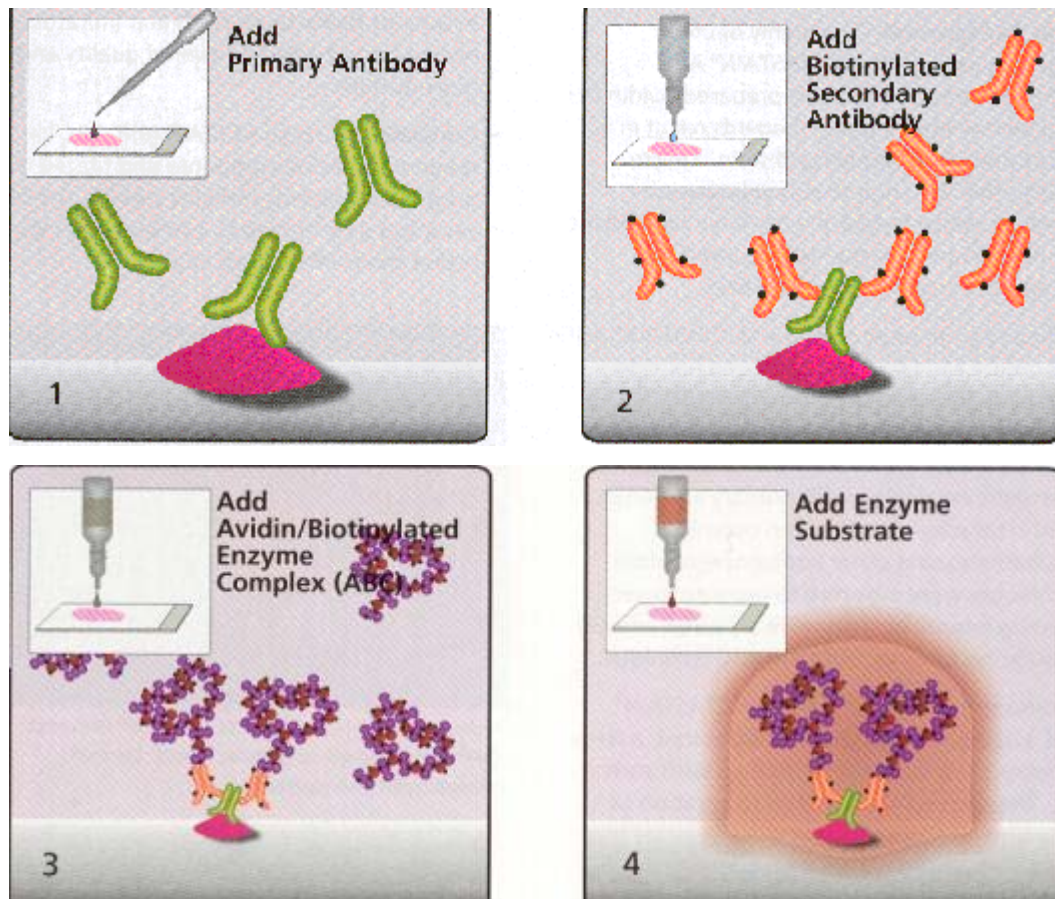


Abb. 5 Schematische Darstellung des Vectastain-Elite-ABC-Kits (132)

### 3.3.4. Bereitstellung des Leinsamenrohextraktes, der Lignane und des 17- $\beta$ -Östradiols für die Stimulationsversuche

Die zu testenden Lignane Secoisolariciresinol, Matairesinol, Enterodiol, Entrolacton, Podophylotoxin, der Rohextrakt und das 17- $\beta$ -Östradiol wurden in 10 % DMSO gelöst und mit destilliertem Wasser zur Herstellung einer Konzentrationsreihe verdünnt. Die Endkonzentration an DMSO lag im Kulturmedium bei 0,1 Vol.-%. Um eventuelle Instabilitäten der wässrigen Lösungen und damit einen Wirkungsverlust oder einen mikrobiel-

len Befall auszuschließen, wurden regelmäßig frische Lösungen hergestellt.

### **3.3.5. Zellkultivierung**

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar Flow Arbeitsbank durchgeführt.

#### **3.3.5.1. Zellkultivierung und Anforderung der Zellen an ihr Milieu**

Die verwendeten Zellen wurden in unverschlossenen Kulturflaschen mit 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> Grundfläche bei 37 °C in einem mit 5 % CO<sub>2</sub> begasten Brutschrank in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Der normale Sauerstoffpartialdruck der Luft ist ausreichend. Die Energiegewinnung in vitro erfolgt über Glykolyse. Zur Kontrolle des pH-Werts wird dem Medium Phenolrot als Indikator zugesetzt. Es färbt sich bei pH 7,4 rot, orange bei pH 7,0 und schließlich gelb bei pH 6,5. Ab dem alkalischen pH-Wert 7,6 verfärbt es sich bläulich rot bis lila.

Da definierten Medien den meisten Zellen nicht ausreichen, wurde mit Blutserum supplementiert. Fetales Kälberserum stellte Hormone, Proteine, Wachstumsfaktoren und Spurenelemente zur Verfügung. Um standardisierte Kulturbedingungen zu schaffen wurde das fetale Kälberserum der gleichen Charge für die Arbeiten verwendet. Die Steroidhormone wurden aus dem fetalen Kälberserum durch Strippen nach der Methode von Soto et al. (121) entfernt.

Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach dem Verbrauch des Mediums und dem vollständigen Bewuchs musste die Zelllinie geteilt werden. Nahezu konfluent gewachsene Zellen wurden mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst und wieder in Suspension gebracht. Ein Teil der Zellen, 1 ml Zellsuspension/13ml Medium, wurde in einer neuen Kulturflasche mit frischem Medium weiterkultiviert oder kryokonserviert. Ein nächster Teil wurde auf die gewünschte Zelldichte eingestellt und in Mikrotiterplatten eingesät. An den Mikrotiterplatten wurden die entsprechenden Tests durchgeführt.

Durch jede Trypsinbehandlung erhöht sich definitionsgemäß die Passagezahl der Zellen. Die Zellkultur kann sich von Passage zu Passage verändern (133, 134), z.B. uniformer und homogener werden, da der Anteil gut proliferierender Zellen zu der schlecht

proliferierender abnimmt. Dem kann man mit geeigneten Kulturbedingungen und einer Nutzung von Zelllinien mit relativ konstanter Passagezahl entgegenwirken. Die Tests wurden alle mit Zellen in der achten, neunten oder zehnten Passage durchgeführt. Zur Verhinderung von mikrobiellem Wachstum wurden Antibiotika und Antimykotika zugesetzt.

#### **3.3.5.2. Kryokonservierung von Zellen**

Eine Konservierung von Kulturzellen kann durch Einfrieren der Zellen in Flüssigstickstoff bei -196 °C erfolgen. Die Zellen werden in einem Einfriermedium aus 10 % FBS, 70 % DMEM-Medium und 20 % DMSO (10%ig) aufbewahrt. Hierfür wurden  $10^7$  Zellen in kaltem Einfriermedium aufgenommen und je 1,5 ml in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden zunächst im Gefrierschrank auf -85 °C gekühlt. Nach 24–48 h wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff umgelagert. Derart eingefroren sind die Zellen jahrelang haltbar und jederzeit wieder auftau-, kultivier- und verwendbar.

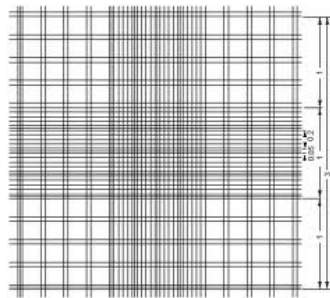
#### **3.3.5.3. Auftauen von Zellen**

Die in Kryoröhrchen als Suspension im Einfriermedium in Flüssigstickstoff aufbewahrten Zelllinien wurden zur Rekultivierung auf 37 °C erwärmt und aufgetaut. Da sich das 10%ige DMSO toxisch auf die Zelllinien auswirkt, wurden die Zellen nach dem Auftauen sofort in 15ml Röhrchen überführt und mit 13ml, 37°C erwärmtem DMEM verdünnt. Die Zellen wurden 10 Minuten bei 1.000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert, in 7ml frischem Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen mit einer Kulturoberfläche von 25cm<sup>2</sup> ausgesät. Um DMSO-Rückstände zu entfernen, wurde das Medium einen Tag später gewechselt. Im Folgenden wurde alle 48 h mikroskopisch die Adhärenz der Zelllinien beobachtet. Bei nicht ausreichender Adhärenz erfolgte ein Mediumwechsel, ansonsten wurde die Zellkultur angelegt.

#### **3.3.5.4. Zellzählung und Einstellung der Zellkonzentration**

Die Zellsuspension wurde nach der Trypsinierung in 10 ml Medium aufgenommen und gründlich geschüttelt. Für die Zellzählung erfolgte eine Verdünnung von 1:20 mit 360 µl

DMEM, 20 µl Zellsuspension und 20 µl Trypanblau. Die Suspension wurde mit dem Vortex-Schüttler vermengt und in eine Pipette aufgezogen. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Bürker-Zählkammer eingesetzt.



**Abb. 6 Zählnetz nach Bürker**

Die Glasplatte enthält eine vertiefte Mittelfläche, auf der quadratische Felder definierter Größe eingätzt sind. Das Zählnetz ist in 9 Quadrate von je 1mm<sup>2</sup> Fläche geteilt. Ein Deckglas wird von der Seite unter gleichmäßigem Druck auf die Zählkammer aufgeschoben und sitzt fest, wenn die

Newton'schen Ringe sichtbar werden. Diese zeigen, dass sich das Deckglas im reproduzierbaren Abstand vom Boden der Kammer befindet. Erst dadurch entsteht der eigentliche Hohlraum mit einer genau definierten Tiefe von 0,1mm, in dem die Auszählung erfolgt.

Auf zwei Kammerfeldern wurden mit der Pipettenspitze je 10 µl Zellsuspension im spitzen Winkel auf die Zählkammer am Rand des Deckglases angesetzt, wobei sich anschließend die Zählkammer mittels Kapillarität von selbst füllte. Es wurden fünfmal fünf Felder ausgezählt. Um die entsprechende Verdünnung von 1:20 zu berücksichtigen wird die Zellzahl mit 10 multipliziert. Nach dem Auszählen der Zellen unter Berücksichtigung der Verdünnung und der anschließenden Multiplikation mit dem Faktor  $1 \times 10^4$  erhält man die Zellzahl pro Volumeneinheit/ml. In den durchgeführten Versuchen wurden sowohl für den BrdU-Test als auch für den MTT-Test Zellkonzentrationen von  $5 \times 10^4$ /ml verwendet. Es wurden alle Zellen innerhalb der Quadrate und die auf dem rechten und unteren Rand liegenden Zellen gezählt. Da bei defekter Zellmembran Trypanblau in die abgestorbenen Zellen eindringt und sie einfärbt, können avitale Zellen identifizieren werden.

### **3.3.5.5. Verwendete Endometriumzellkulturen**

#### **3.3.5.5.1. Ishikawa**

Die Ishikawa Zelllinie ist eine humane Endometriumkarzinomzelllinie, bestehend aus Drüsenzellen, die von einem gut differenzierten, endometrialen Adenokarzinom einer 39jährigen asiatischen Patientin stammte. Die Zelllinie Ishikawa wurde 1985 von Nishi-

da (135) aus einem Adenokarzinom im menschlichen Endometrium isoliert und etabliert (136, 137). Diese Zelllinie exprimiert einen funktionellen ER (135, 138, 139), einen E2 induzierbaren Progesteronrezeptor (138, 140) und einen Androgenrezeptor. Sie enthält sowohl ER- $\alpha$  als auch ER- $\beta$  und ist östrogenresponsiv. An Ishikawa Zelllinien werden sowohl Untersuchungen in Zellkulturen als auch im Tumorgewebe von Mäusen durchgeführt, nachdem durch Zellimplantation ein Endometriumkarzinom induziert wurde (135).

#### **3.3.5.5.2. MFE-280**

Laut Angaben der Hersteller ist die Zelllinie MFE-280 eine humane Endometriumkarzinomzelllinie aus Drüsenzellen, die einem epithelial wiederkehrenden, schlecht differenzierten, endometrialem Adenokarzinom einer 78jährigen kaukasischen Patientin entstammen. Initial sind die Zellen als Aggregat in einer Suspension für ein Jahr gewachsen und wurden dann als monolaye Kultur (Molekularschicht) transferiert. Die Karyotyp-Analysen zeigten ein fast diploides Zellbild mit heterogenen komplexen Abweichungen. Enthält sowohl ER- $\alpha$  als auch ER- $\beta$  und ist östrogenresponsiv. An der Zelllinie MFE-280 wurden Untersuchungen in Zellkulturen durchgeführt. Im Tiermodell zeigte sich, dass sie bei Mäusen kanzerogen sind (141, 142).

#### **3.3.5.5.3. RL95-2**

Die Zelllinie RL95-2 ist eine humane Endometriumkarzinomzelllinie, die einem epithelalem, endometrialem Karzinom einer 65jährigen kaukasischen Patientin entnommen wurden. 1983 charakterisierten Way et al. (143) diese Zelllinie. Es handelt sich um ein mäßig differenziertes (Grad 2) adenosquamöses Karzinom des Endometriums. Die Kerne sind groß und unregelmäßig. Die Zellen haben eine Verdopplungszeit von 22 bis 34 Stunden (143). Sie enthalten sowohl ER- $\alpha$  als auch ER- $\beta$  und sind östrogenresponsiv. Laut Angaben von ATCC verfügten die Zellen über Alpha-Keratin, gut ausdifferenzierte junctionale Komplexe, Tonofilamente und Oberflächenmikrovilli.

### **3.3.5.6. Anlegen der Endometriumzellkulturen als Vorbereitung für die Testdurchführung**

Die Inkubation ist im Folgenden für alle Endometriumzellkulturen beschrieben.

Die Zellen wuchsen als Monolayer in DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,5 % Amphotericin B. Für die Testvorbereitung wurden die Zellen mikroskopisch begutachtet und das DMEM vorsichtig entfernt. Um den Einfluss der Steroidhormone im fetalen Kälberserum zu minimieren, wurde nach ca. 50%iger Konfluenz auf ein delipidiertes Medium und gestripptes fetales Kälberserum umgestellt. Das phenolrotfreie MEM und mit 5 % Aktivkohlebehandelte hormonfreie FBS wurde 3 Tage lang alle 24 Stunden gewechselt. Dadurch wurde die Grundexpression an östrogensensitiven Genen reduziert. Nach 3 Tagen erreichten die Zellen eine fast vollständige Konfluenz. Es wurden 10 ml PBS zum Waschen dazugegeben und anschließend 4 ml Trypsin zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden verwendet. Die Kulturen wurden für fünf Minuten in den Brutschrank zurückgelegt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 13 ml Medium, es wurde mindestens das 1,5-Fache der Trypsinmenge verwendet, gestoppt. Die Suspension wurde danach 10 min bei 1000 U/min ( $10^4$  1000U/min) zentrifugiert, der Überstand abgegossen und 5 ml frisches Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden mit der Bürker-Zählkammer gezählt und so verdünnt, dass  $5 \times 10^3$  Zellen in je 100 µl Medium vorhanden waren.

### **3.3.6. Zelltestung**

Im Folgenden wird die Vorbereitung der Mikrotiterplatten für den BrdU- als auch MTT-Test beschrieben.

Es wurden auf die Mikrotiterplatten jeweils 100 µl Endometriumzellsuspension pro Well pipettiert, anschließend wurde den Zellen je 1 µl der zu testenden Verbindungen dazu dosiert, sodass sich im Medium eine Endkonzentration an DMSO von 0,1 % einstellte. Die selbst hergestellten Rohextrakte und die industriell produzierten Lignane wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen, 30 µM und 1mM, mit jeweils 4 Parallelansätzen auf die benötigte Anzahl 96er-Wellplatten aufgetragen.

Diese Ansätze wurden nun für 48 h bei 37 °C / 5 % CO<sub>2</sub> ohne, als Kontrollgröße, und mit



den Phytoöstrogenextrakten inkubiert. Die anschließenden Testungen wurden wie folgend beschrieben durchgeführt.

#### **3.3.6.1. BrdU-Test**

Der 5-Bromo-2'-deoxy-Uridin-Test ist ein Proliferationsassay, welcher auf dem ELISA-Prinzip basiert.

Eine vermehrte DNA-Synthese und somit Zellproliferation kann mithilfe von BrdU sichtbar gemacht werden. Dem Nährmedium wird das Nukleosid BrdU zugegeben, welches dann als Analogon zum intrazellulär synthetisierten Thymidin während der Replikation in die DNA eingebaut wird. Durch die Bindung eines mit Peroxidase gekoppelten monoklonalen Antikörpers an das BrdU-Molekül kann die Menge an eingebautem BrdU bestimmt werden, sie entspricht der Menge neu synthetisierter DNA in der Zelle.

Nach Zugabe und Spaltung des Peroxidasesubstrates wurde das farbige Endprodukt photometrisch bestimmt. Je intensiver die Farbgebung, desto mehr DNA wurde synthetisiert. Nach mehreren Wasch-, Markierungs- und Inkubationsschritten erfolgte die Messung der Absorption in einem ELISA-Reader mit einem Messfilter von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 492 nm. Die entstandenen Farbstoffe und damit die Absorption sind somit proportional zur Zahl der proliferierenden Zellen.

Die Testdurchführung fand nach Herstelleranweisung für das 5-Bromo-2'-deoxy-Uridine Labeling and Detection Kit III für adhärente Zellen wie folgt beschrieben statt:

- Nach Applikation von je 10 µl der BrdU labeling solution pro Well unter sterilen Bedingungen wurden die Zellen für zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.
- Das Zellkulturmedium mit der Labeling solution wurde vorsichtig entfernt.
- Die Zellen wurden dreimal mit 200 µl Waschmedium (DMEM und 10 % FBS) gewaschen.
- Die Zellen wurden bei -20 °C für 30 min fixiert.
- Die Fixierlösung wurde danach vorsichtig entfernt.

- Es erfolgte erneutes dreimaliges Waschen mit dem Waschmedium.
- Je 100 µl Nukleaselösung wurden pro Well dazugegeben.
- Es folgte die Inkubation im Schüttelinkubator bei 37 °C für 30 min.
- Die Nukleaselösung wurde vorsichtig entfernt.
- Erneutes dreimaliges Spülen mit Waschmedium schloss sich an.
- Je 100 µl des monoklonalen Anti-BrdU-Antikörpers wurden pro Well zugegeben.
- Es folgte die Inkubation im Schüttelinkubator bei 37 °C für 30 min.
- Der Antikörper wurde entfernt.
- Es erfolgte erneutes dreimaliges Waschen mit Waschmedium.
- 100 µl der Peroxidase-Substratlösung wurden unter dem Abzug pro Well dazugegeben.
- Bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation des Substrates bis zum Farbumschlag der Proben.
- Abschließend wurde die Extinktion der Proben am ELISA-Reader bei 405 nm Wellenlänge gegenüber einer Referenzwellenlänge von 492 nm gemessen.

In den durchgeführten Versuchen wurden die Extinktionswerte nach Stimulation mit den Phytoöstrogenen, den unstimulierten Kontrollreihen sowie den nach 17-β-Östradiol- und Podophyllotoxinstimulation ermittelten Werten verglichen.

#### **3.3.6.2. MTT-Test**

Der MTT-Assay stellt einen Proliferationstest dar und misst die Zellviabilität (Zelllebensfähigkeit) anhand der Atmungsaktivität der Mitochondrien. Der gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) gelangt in die metabolisch aktive Zelle und wird dort durch das Enzym Succinat-Dehydrogenase in den Mitochondrien lebender Zellen zum unlöslichen Formazanfarbstoff reduziert, sodass dieser zum blauen Formazansalz auskristallisiert. Es ist eine Farbreaktion, mit der die Aktivität der Mitochondrien in der Zelle nachgewiesen werden kann, ohne dass die Zelle DNA synthetisieren muss. Die Kristalle werden durch Zugabe einer Solubilisierungslösung aufge-

löst. Die Färbung der Lösung wird anschließend photometrisch mit dem ELISA-Reader gemessen.

Die Testdurchführung lief nach Herstelleranweisung für das Cell Proliferation Kit I (MTT) wie folgt ab:

- Nach Applikation von je 10 µl des MTT labeling reagent pro Well unter sterilen Bedingungen wurden die Zellen für 4 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.
- Zum Lösen der Formazankristalle wurde je Well 100 µl der Solubilisierungslösung auf die Zellen aufgetragen.
- Es erfolgte die Inkubation der Proben über 24 h im Brutschrank bei 37 °C.
- Am nächsten Tag wurde die optische Dichte am ELISA-Reader bei 570 nm Wellenlänge gemessen.

Die Anzahl der Zellen bzw. des gebildeten Formazansalzes korrelierte mit der Höhe der entstandenen Farbstoffe und damit der gemessenen Absorption. Die Konzentration, die proportional zur Zahl der lebenden Zellen war, wurde photometrisch mit einem ELISA-Reader bestimmt. Der Grad des MTT-Umsatzes gilt als Maß für die Lebensfähigkeit der Zelle.

### **3.3.7. Zusammenfassung des methodischen Ablaufs der Untersuchung**

#### **3.3.7.1. Verwendete Phytoöstrogene und Lösungsvermittler**

Der Leinsamenrohextrakt wurde mittels Kaltextraktion isoliert. Anschließend wurden die Bestandteile des Rohextraktes mit HPLC-MS identifiziert. Vor dem Auftragen auf die Zellkulturen wurden die Extrakte in einen geeigneten Lösungsvermittler gegeben. Nach mehreren Löslichkeitsversuchen entschieden wir uns für DMSO 0,1 %, da es sich als geeigneter Lösungsvermittler erwies und in seiner Konzentration keine verändernde Wirkung auf die Zellkulturen ausübte. Gleichzeitig mit dem Rohextrakt wurden die industriell hergestellten Lignane Matairesinol, Secoisolariciresinol, Enterodiol und Enterolacton an den Endometriumkarzinomzelllinien im BrdU- und MTT-Assay getestet.

### **3.3.7.2. Verwendete Zelllinien**

Es wurden folgende Zelllinien verwendet:

- Ishikawa, gut differenziertes, endometriales Adenokarzinom
- RL95-2, mäßig differenziertes, epitheliales adenosquamöses Endometriumkarzinom
- MFE-280, schlecht differenziertes, endometriales Adenokarzinom

### **3.3.7.3. Testung der Zellproliferation**

Die Zellproliferation wurde mittels BrdU-Labeling and Detection Kit III und MTT Cell Proliferation Kit I nach Anleitung des Herstellers analysiert. Die Zellen wuchsen in 96er-Mikrotiterplatten ohne, als Kontrollgröße, oder mit verschiedenen Phytoöstrogenextrakten. Die Proliferation wurde photometrisch als Extinktion mit einem ELISA-Reader bestimmt. Von allen Ansätzen wurden je 4 Parallelen durchgeführt. Insgesamt wurden die entsprechenden Experimente viermal wiederholt.

### **3.3.8. Statistische Auswertung**

#### **3.3.8.1. Statistik**

Alle gewonnenen Messdaten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel archiviert, wobei aus 16 gewonnenen Werten der Mittelwert sowie die Standardabweichung errechnet wurden. Die Daten der stimulierten Zellreihen wurden mit denen der unstimulierten Kontrollgruppe sowie mit Podophyllotoxin, der Positivkontrolle bezüglich der Zelltoxizität, und 17- $\beta$ -Östradiol, der Positivkontrolle bezüglich der Proliferation, verglichen. Um Verwirrungen bei der Nomenklatur zu vermeiden, wurden anschließend als Leerkontrolle die unstimulierte Kontrollgruppe, als Positivkontrolle 17- $\beta$ -Östradiol und Podophyllotoxin als Toxizitätskontrolle festgelegt. Mithilfe des Statistikprogramms SPSS16 erfolgte die statistische Auswertung über die Varianzanalyse einzelner Gruppen. Dabei wurde für die Berechnung der Signifikanz der Kruskal-Wallis-Test als parameterfreier statistischer Test angewandt, mit dem im Rahmen einer Varianzanalyse verglichen wird, ob sich zwei unabhängige Stichproben hinsichtlich ihres

Mittelwerts unterscheiden. Der Kruskal-Wallis-Test erlaubt den Vergleich quantitativer Zielgrößen in nicht normalverteilten unabhängigen Stichproben. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p > 0,05$  wurde ein nicht signifikanter,  $p 0,01–0,05$  ein statistisch signifikanter, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $0,001–0,01$  ein statistisch hoch signifikanter und bei  $p \leq 0,001$  ein statistisch höchst signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen angenommen. Die einzelnen Parameter wurden in Säulendiagrammen dargestellt.

#### **3.3.8.2. IC<sub>50</sub>-Wert**

Als Maß der zytotoxischen Wirkung wurde der IC<sub>50</sub>-Wert gesetzt. Das ist der Wert, bei dem die Absorption auf 50 % einer Vergleichsprobe sinkt. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden aus den Säulendiagrammen generiert. Sie repräsentieren z.B. beim MTT-Test die Konzentration der Verbindungen, bei der die Absorption, die direkt proportional zu dem gebildeten Formazanfarbstoff und damit auch zu der Zellzahl ist, auf 50 % der unbehandelten Vergleichsprobe absinkt.

### **4. Ergebnisse**

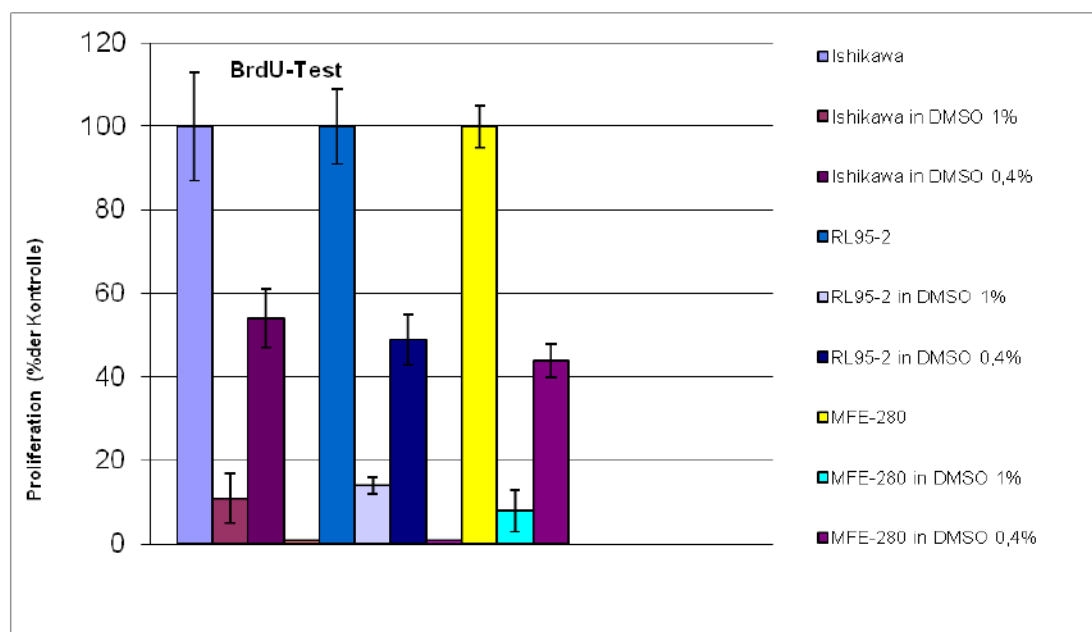
#### **4.1. Ergebnisse der Löslichkeitsversuche und des Lösungsmiteleinflusses**

Um wasserunlösliche Testsubstanzen zu verwenden, ist der Einsatz eines geeigneten Lösungsmittels unumgänglich. Damit bei der Untersuchung der Einfluss der Testsubstanz von der des Lösungsmittels unterschieden werden kann, muss die Wirkung des Lösungsmittels bekannt sein. Bei der Testung der Löslichkeit der untersuchten Lösungsmittel stellte sich heraus, dass die Phytoöstrogene sehr gut in DMSO und in Ethanol gelöst werden können. Je höher die DMSO- oder Ethanol-Konzentration gewählt wurde, desto leichter gingen die Phytoöstrogene in Lösung. Bei dem Versuch, die Phytoöstrogene in DMEM oder PBS zu lösen, blieben bereits makroskopisch sichtbare Schwebepartikel der teils gelösten Phytoöstrogene im Lösungsmedium.

S. Köller zeigt in seiner Dissertation (144), dass 0,2 % Ethanol die Zellmenge der getesteten MCF-7-Zellen auf 85 % herabsetzte, während 0,2 % DMSO im Medium mit einer Zellzahl von 99,9 % fast keinen Einfluss auf die Zellmenge hatte. Ethanol wurde somit

trotz guter Eignung als Lösungsvermittler nicht von uns präferiert. Wir führten die weiteren Untersuchungen mit DMSO fort.

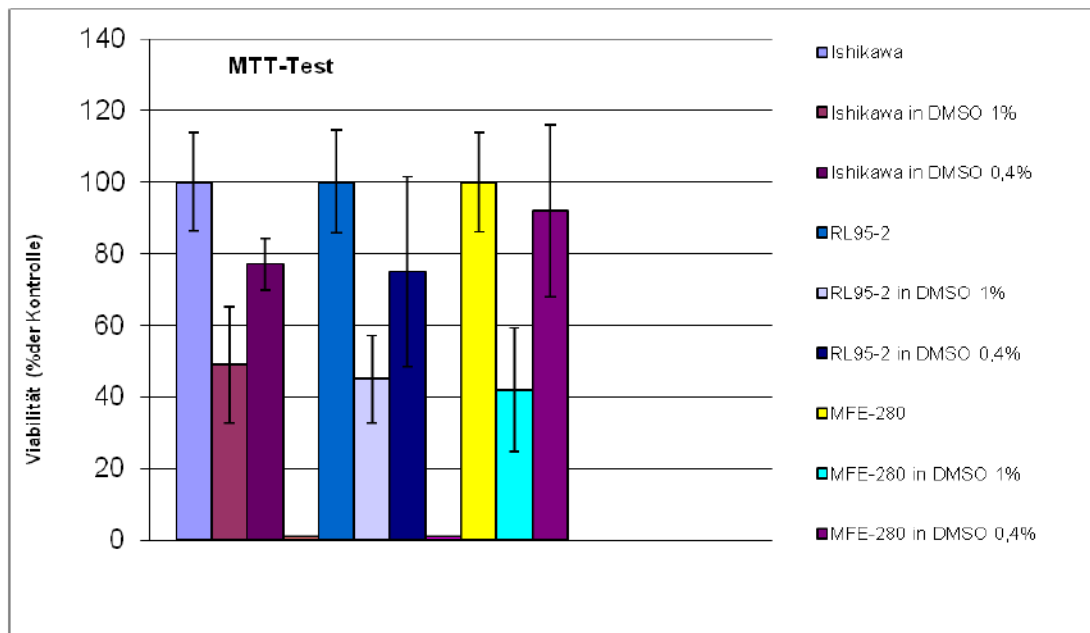
In Vorversuchen zur Lösungsmittelkonzentration im Medium wurden DMSO in 0,4 % und 1 % an den Zelllinien Ishikawa, RL95-2 und MFE-280 getestet. Setzte man die relative Zellzahl im Medium ohne DMSO 100 %, so erniedrigte sich die Zellmenge wie folgt (Abb. 7) im BrdU-Test: mit 0,4 % DMSO bei Ishikawa auf 54 %, bei RL95-2 auf 49 % und bei MFE-280 auf 44 %, mit 1 % DMSO auf 11 % bei Ishikawa, auf 14 % bei RL95-2 und auf 8 % bei MFE-280.



**Abb. 7 Lösungsmiteleinfluss im BrdU-Test**

Proliferationsrate der getesteten Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa, RL95-2 und MFE-280 nach 48 h Stimulation mit DMSO in zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Kontrolle dienten im Medium kultivierte Zellen. Die Balken zeigen den Mittelwert der 16 gewonnenen Werte aus 4 Experimenten +/- SD.

Der Zusatz von 0,4 % DMSO zum Medium im MTT-Test (Abb. 8) erniedrigte die Zellmenge bei Ishikawa auf 77 %, bei RL95-2 auf 75 % und bei MFE-280 auf 92 %. Bei 1 % DMSO zeigte sich eine Reduktion der Zellen bei Ishikawa auf 49 %, bei RL95-2 auf 45 % und bei MFE-280 auf 42 %.

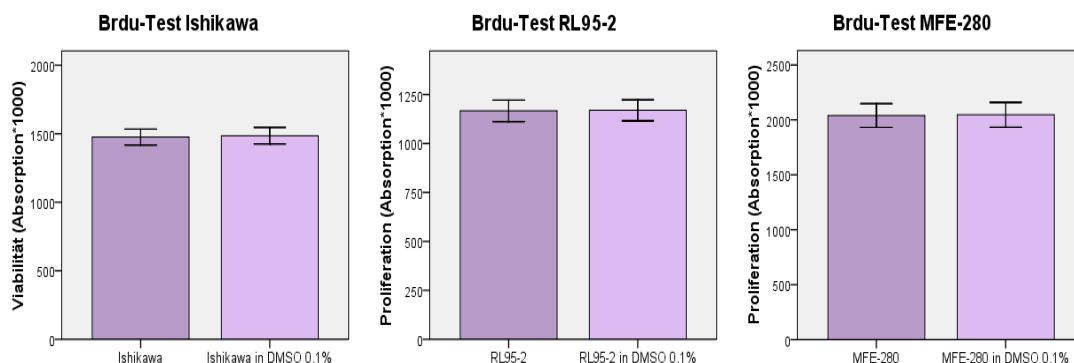


**Abb. 8 Lösungsmiteleinfluss im MTT-Test**

Einfluss auf die Viabilität der getesteten Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa, RL95-2 und MFE-280 nach 48h Stimulation mit DMSO in zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Kontrolle dienten nur im Medium kultivierte Zellen. Die Balken zeigen den Mittelwert der 16 gewonnenen Werte aus 4 Experimenten  $\pm$  SD.

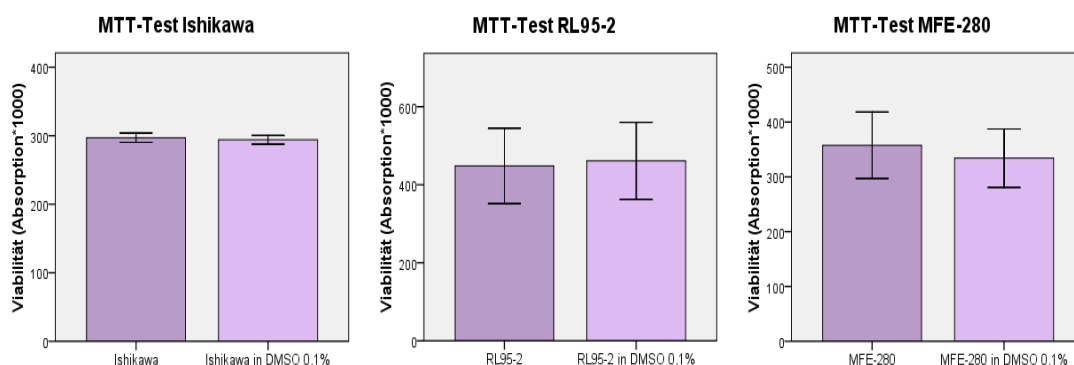
Im Gegensatz dazu wird die Zellmenge durch 0,1 % DMSO als Lösungsmittel weder im BrdU- noch im MTT-Assay an keiner der getesteten Zelllinien negativ beeinflusst und hat somit minimalen Einfluss auf die Zellrate. Im BrdU-Test (Abb. 9) zeigte sich in allen drei Zelllinien eine Proliferationssteigerung um 0,67 % bei der Ishikawa-, um 0,34 % bei der RL95-2- und um 0,32 % bei der MFE-280-Zellpopulation. Im MTT-Test (Abb. 10) der RL95-2-Zellen lag die Proliferationssteigerung bei 2,8 %, bei den Ishikawa- und RL95-2-Zellen kam es zu einem Abfall der Zellen um 1,02 % bzw. 7,04 %. Somit wurde für unsere Versuchsreihe 0,1 % DMSO eingesetzt, da es sich als geeigneter Lösungsvermittler und in dieser Konzentration an keiner der Zelllinien als verändernd auf die Zellrate oder gar toxisch erwies.

Auch Yang et al. (145) setzten 0,1 % DMSO ein, um die Wirkung von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin auf Stromazellen zu untersuchen.



**Abb. 9 Einfluss DMSO 0,1 % im BrdU-Test**

Proliferationsrate der getesteten Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa, RL95-2 und MFE-280 nach 48 h Stimulation mit DMSO 0,1 %. Als Kontrolle dienten im Medium kultivierte Zellen. Die Balken zeigen den Mittelwert der 16 gewonnenen Werte aus 4 Experimenten +/- SD.



**Abb. 10 Einfluss DMSO 0,1 % im MTT-Test**

Einfluss auf die Viabilität der getesteten Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa, RL95-2 und MFE-280 nach 48 h Stimulation mit DMSO 0,1 %. Als Kontrolle dienten im Medium kultivierte Zellen. Die Balken zeigen den Mittelwert der 16 gewonnenen Werte aus 4 Experimenten +/- SD.

#### 4.2. Ergebnisse der Strukturanalyse des Leinsamenrohextraktes mittels HPLC-MS

Die HPLC-MS des Leinsamenrohextraktes zeigte ein sehr heterogenes Stoffgemisch. Neben Lignanen und Isoflavonen musste von der Existenz einer Vielzahl weiterer Inhaltsstoffe ausgegangen werden. Die Tabelle 2 zeigt die mittels HPLC-MS detektierten Lignane und Isoflavone des Leinsamenrohextraktes (130).



**Tab. 2 Übersicht der identifizierten Lignane und Isoflavone des Leinsamenrohextraktes mittels High Performance Liquid Chromatography-Massenspektrometrie**

<b>Detektierte Lignane</b>	<b>Masse pro Einheit in [g/mol]</b>	<b>Detektierte Isoflavone</b>	<b>Masse pro Einheit in [g/mol]</b>
Secoisolariciresinol	362,4	Genistein-Dimer	540,4
Secoisolariciresinol-Dimer	724,8	Genistein-Glycosid	432,4
Secoisolariciresinol-Glycosid-Dimer	1049,2	Genistein-Diglycosid	594,6
Arctigenin-Glycosid-Dimer	1069,2	Daidzein-Diglycosid	578,6
Pinoresinol-Addukt	434,4	Biochanin A-Glycosid	446,4
Pinoresinol-Glycosid-Dimer	1073,2	Biochanin A-Diglycosid	608,6

Nach weiterer Fraktionierung des Pflanzenrohextraktes aus dem Leinsamen konnten zusätzlich die Lignane Matairesinol und Matairesinol-Addukt; Isolariciresinol-Addukt, Isolariciresinol-Glycosid-Dimer und Isolariciresinol-Diglycosid sowie Lariciresinol-Addukt und Lariciresinol-Glycosid-Dimer gefunden werden (130).

Die durch HPLC-MS ermittelte mittlere molare Masse des durch uns hergestellten Rohextraktes betrug 1030 g/mol (122). Die molaren Massen der industriell gewonnenen Lignane lagen nach Angaben der Hersteller bei 362,42 g/mol für Secoisolariciresinol, 358,39 g/mol für Matairesinol, 302,36 g/mol für Enterodiol, 298,33 g/mol für Enterolacton, 414,411 g/mol für Podophyllotoxin und 272,38 g/mol für 17- $\beta$ -Östradiol.

### **4.3. Ergebnisse der Zellkultivierung**

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Zellkultivierung der drei verwendeten Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa, RL95-2 und MFE-280 abgebildet und beschrieben.

#### **4.3.1. Kultivierung der Zelllinie Ishikawa**

Die Zellen der Zelllinie Ishikawa entwickelten nach fünf bis sechs Tagen einen flächigen epithelartigen Zellrasen. Nachdem eine fast vollständige Konfluenz erreicht war, folgte die Aussaat (Abb. 11).

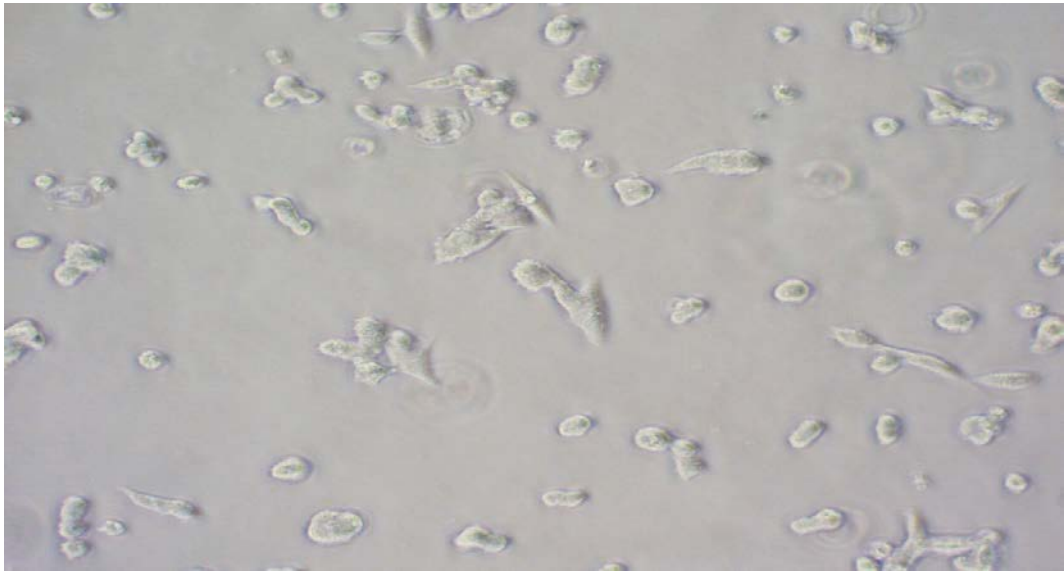


**Abb. 11 Zelllinie Ishikawa**

Mikroskopische Aufnahme der Zelllinie Ishikawa bei 20-facher Vergrößerung

#### **4.3.2. Kultivierung der Zelllinie RL95-2**

Die Zellkolonien der RL95-2 Zelllinie entwickelten nach ca. sechs Tagen einen flächigen epithelartigen Zellrasen. Nach Erreichen einer fast vollständigen Konfluenz erfolgte die Aussaat (Abb. 12).



**Abb. 12 Zelllinie RL95-2**

*Mikroskopische Aufnahme der Zelllinie RL95-2 bei 20-facher Vergrößerung*

#### **4.3.3. Kultivierung der Zelllinie MFE-280**

Das Wachstumsmuster der MFE-280 Zelllinie ist flächig und epithelartig und erreichte nach ca. sechs Tagen eine 80–90%ige Konfluenz. Daraufhin wurden die Zellen ausgesät (Abb. 13).



**Abb. 13 Zelllinie MFE-280**

Mikroskopische Aufnahme der Zelllinie MFE-280 bei 20-facher Vergrößerung

#### 4.4. Ergebnisse der immunzytochemischen Charakterisierung

Es erfolgte die immunzytochemische Charakterisierung der verwendeten Zellkulturen zum Nachweis des Progesteronrezeptors, des ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ .

Das immunhistochemische Verfahren nutzt die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen am histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Es wurden ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen den humanen Progesteronrezeptor und ein monoklonaler Antikörper gegen die ER eingesetzt. Für die vorliegende Arbeit wurden der Progesteronrezeptor, der ER- $\alpha$  und der ER- $\beta$  immunhistochemisch getrennt voneinander bestimmt. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte semiquantitativ unter dem Lichtmikroskop bei zehnfacher Vergrößerung. Alle immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden von zwei Beobachtern beurteilt. Die entsprechende Intensität der Färbung wurde nach Remmele und Schikedanz (146) in vier Bereiche eingeteilt:

- keine Färbung – negativ = keine Rezeptorexpression
- schwache Färbung (dunkelgelb) – schwach positiv = schwache Rezeptorexpression
- mittlere Färbung (hellbraun) – mäßig positiv = mittlere Rezeptorexpression
- starke Färbung (dunkelbraun) – stark positiv = starke Rezeptorexpression

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der jeweiligen Färbungen für die getesteten Zelllinien dargestellt.

**Tab. 3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung zur Darstellung der Rezeptorexpression der drei verwendeten Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa, RL95-2 und MFE-280**

	Ishikawa-Zellen	RL95-2-Zellen	MFE-280-Zellen
Progesteronrezeptor	stark positiv	stark positiv	schwach positiv
Östrogenrezeptor $\alpha$	stark positiv	stark positiv	stark positiv
Östrogenrezeptor $\beta$	schwach positiv	stark positiv	stark positiv

#### **4.5. Ergebnisse des MTT-Assay**

Im Folgenden werden die Ergebnisse des MTT-Assays nach 48 h Stimulation mit dem Leinsamenrohextrakt, den Lignanenen, dem Podophyllotoxin und dem 17- $\beta$ -Östradiol an den verwendeten Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa, RL95-2 und MFE-280 grafisch in Säulendiagrammen und anschließend tabellarisch dargestellt. Statistisch signifikante Ergebnisse sind entsprechend gekennzeichnet. Alle Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  wurden mit einem Sternchen (\*), bei  $p < 0,01$  mit zwei Sternchen (\*\*) und bei  $p < 0,001$  mit drei Sternchen (\*\*\*) gekennzeichnet. In den Diagrammen sind die Extinktionswerte als Maß der metabolischen Aktivität der Zellen hinsichtlich der jeweils verwendeten Probe abgebildet. Die Balken zeigen den Mittelwert der 16 gewonnenen Werte aus 4 Experimenten  $\pm$  SD. Die Konzentrationen der Extrakte und der Kontrollen werden in Mol angegeben. Der Leinsamenrohextrakt und die Lignane wurden jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen von 30  $\mu$ M und 1 mM untersucht. Die mitgeführten Kontrollen 17- $\beta$ -Östradiol wurden in einer Konzentration 10E-9 mol/l und Podophyllotoxin in einer Konzentration von 30  $\mu$ M durchgeführt.

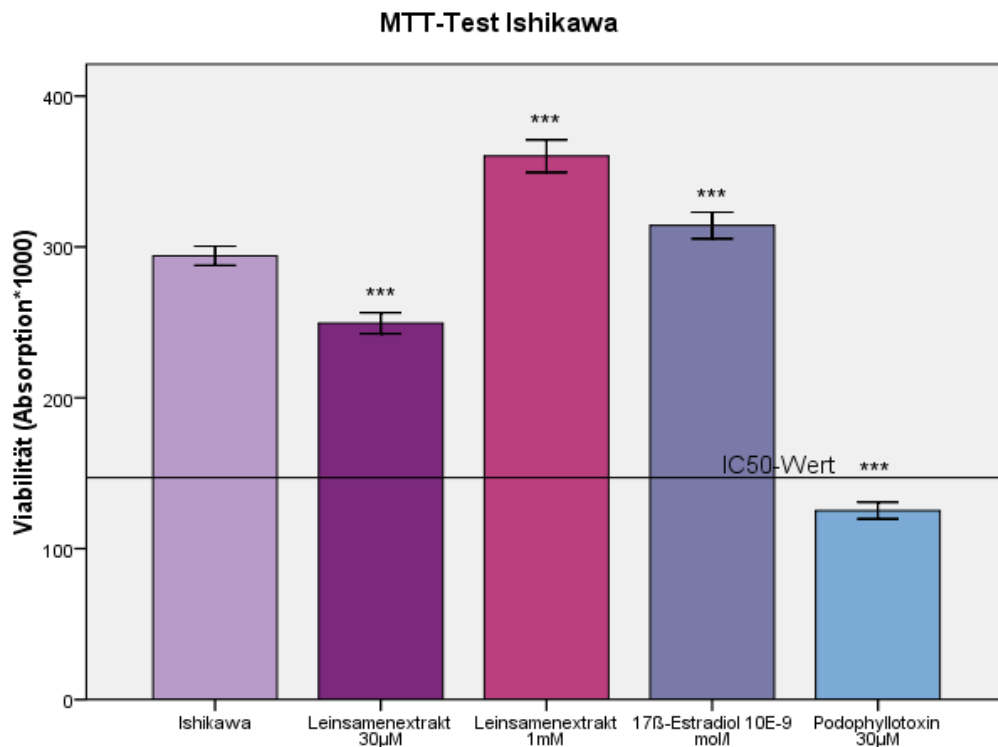
Als Maß der zytotoxischen Wirkung wurde der IC<sub>50</sub>-Wert aus den Säulendiagrammen bestimmt. Der Wert repräsentiert die Konzentration der Verbindungen, bei der die Absorption, die direkt proportional zum gebildeten Formazanfarbstoff und zur Zellzahl ist, auf 50 % der unbehandelten Vergleichsprobe sinkt.

##### **4.5.1. MTT-Test mit Leinsamenrohextrakt**

###### **4.5.1.1. MTT-Test Ishikawa**

Um den Einfluss des Leinsamenrohextraktes auf die Viabilität der Ishikawa-Zellen zu testen, wurde der MTT-Test durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Der Leinsamenrohextrakt zeigte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle in der niedrigen Konzentration von 30  $\mu$ M einen signifikant hemmenden Einfluss von 15,19 % ( $p < 0,001$ ). In der höheren Konzentration von 1 mM war eine signifikante Stimulation der Proliferation ( $p < 0,001$ ) von 22,46 % nachweisbar. Eine Zytotoxizität und somit der IC<sub>50</sub>-Wert des Rohextraktes war nicht feststellbar. Das als Positivkontrolle eingesetzte 17- $\beta$ -Östradiol zeigte mit 6,84 % eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Stimulation der Proliferati-

onsrate. Bei Podophyllotoxin als Toxizitätskontrolle in der Konzentration von 30µM kam es zu einer signifikanten Hemmwirkung von 57,42 % ( $p < 0,001$ ) auf die Zellproliferation. Ein  $IC_{50}$ -Wert und somit eine Toxizität ließ sich nur bei Podophyllotoxin nachweisen.



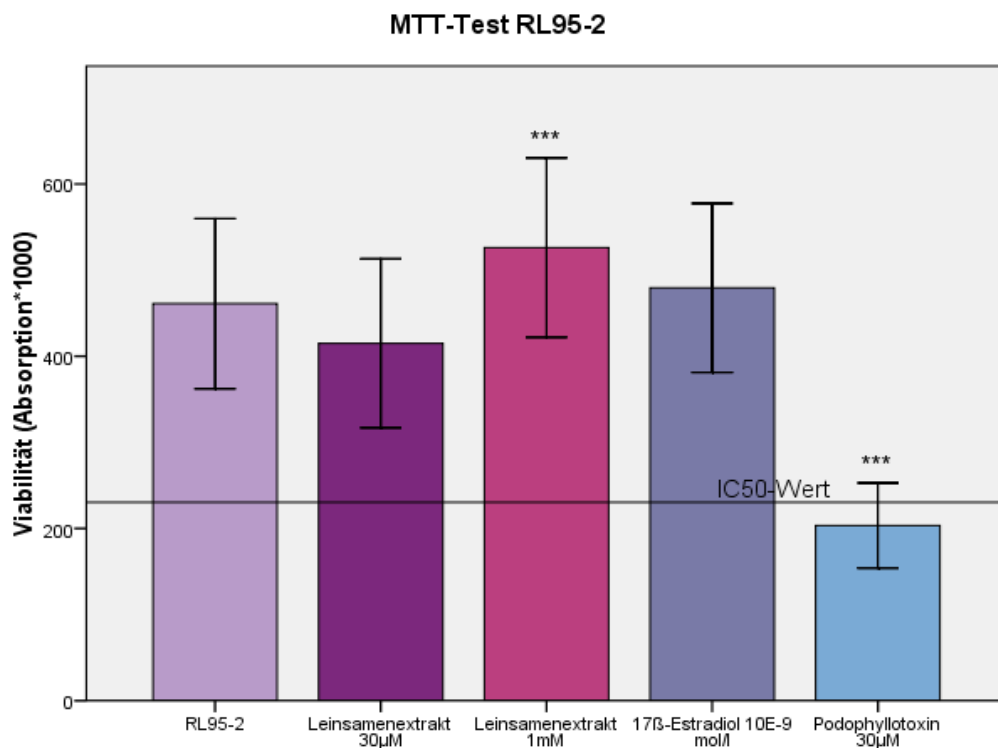
**Abb. 14 MTT-Test Ishikawa mit Leinsamenrohextrakt**

Einfluss auf die Viabilität der Ishikawa-Zellen nach 48h Stimulation mit Leinsamenrohextrakt in zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Vergleichsgruppen fungierten unstimulierte Ishikawa-Zellen (Negativkontrolle) sowie mit 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) stimulierte Zellen.

#### 4.5.1.2. MTT-Test RL95-2

Der Einfluss des Leinsamenrohextraktes auf die Zelllebensfähigkeit der RL95-2 ist in Abbildung 15 dargestellt. Der Leinsamenrohextrakt wies in der niedrigen Konzentration von 30µM im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle einen tendenziell hemmenden Einfluss von 10,0 % ( $p = 0,164$ ) auf. In der höheren Konzentration von 1mM war ein signifikanter Wachstum der Zellpopulation um 14,1 % ( $p < 0,001$ ) nachweisbar. Eine Zyto-

toxizität des Leinsamenrohextraktes und des  $IC_{50}$ -Wertes waren nicht feststellbar. Das als Positivkontrolle eingesetzte 17- $\beta$ -Östradiol zeigte eine nicht signifikante Wachstumsstimulation von 4,0 % ( $p=0,051$ ). Das Podophyllotoxin als Toxizitätskontrolle in der Konzentration von 30  $\mu$ M hemmte signifikant um 55,9 % ( $p<0,001$ ) die Proliferation. Der  $IC_{50}$ -Wert und somit eine toxische Wirkung ließ sich nur bei Podophyllotoxin nachweisen.



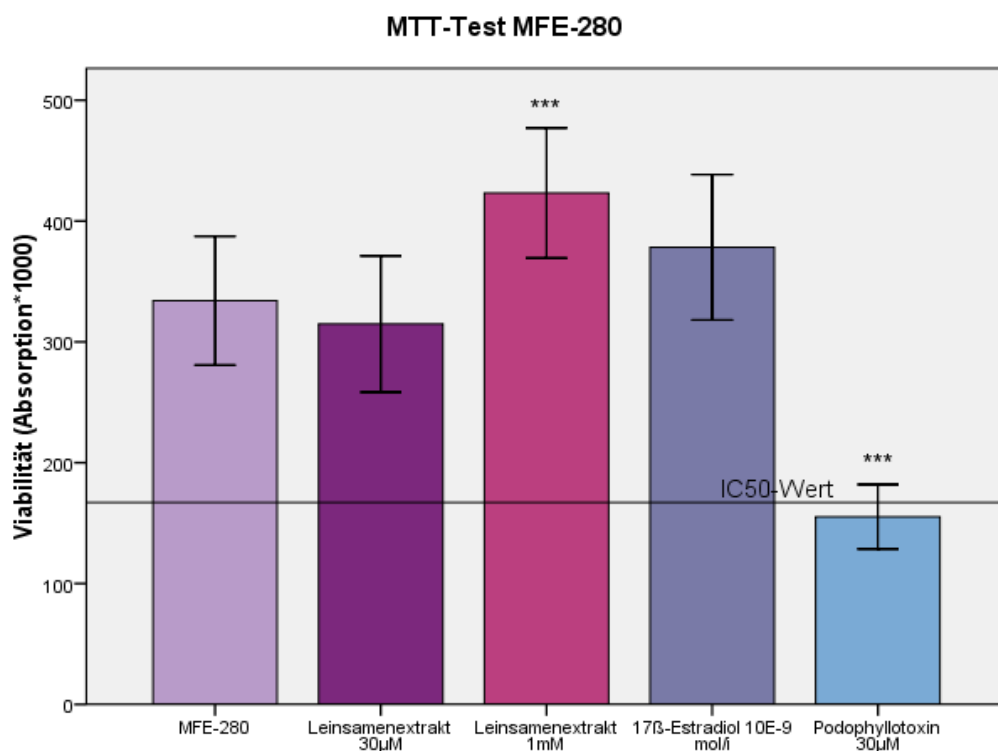
**Abb. 15 MTT-Test RL95-2-Zellen mit Leinsamenrohextrakt**

Einfluss auf die Viabilität der RL95-2-Zellen nach 48 h Stimulation mit Leinsamenrohextrakt in zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Vergleichsgruppen fungierten unstimulierte RL95-2-Zellen (Negativkontrolle) sowie mit 17- $\beta$ -Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) stimulierte Zellen.

#### 4.5.1.3. MTT-Test MFE-280

Die Viabilität der MFE-280-Zellen nach Stimulation mit dem Leinsamenrohextrakt ist in Abbildung 16 dargestellt. Der Leinsamenrohextrakt bewirkte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle in der niedrigen Konzentration von 30  $\mu$ M einen hemmenden Einfluss

von 5,8 % ( $p=0,162$ ). In der höheren Konzentration von 1mM zeigte sich eine signifikante Stimulation von 26,66 % ( $p<0,001$ ). Ein  $IC_{50}$ -Wert oder eine Zytotoxizität des Leinsamenrohextraktes konnte nicht ermittelt werden. Das als Positivkontrolle eingesetzte 17- $\beta$ -Östradiol zeigte eine nicht signifikante Stimulation von 13,22 % ( $p=0,062$ ). Bei Podophyllotoxin als Toxizitätskontrolle in der Konzentration von 30 $\mu$ M kam es zu einer deutlichen Hemmwirkung von 53,54 % ( $p<0,001$ ) auf die Viabilität der Tumorzellen. Ein  $IC_{50}$ -Wert und somit eine Toxizität präsentierte nur das Podophyllotoxin.



**Abb. 16 MTT-Test MFE-280-Zellen mit Leinsamenrohextrakt**

Einfluss auf die Viabilität der MFE-280-Zellen nach 48 h Stimulation mit Leinsamenrohextrakt in zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Vergleichsgruppen fungierten unstimulierte MFE-280-Zellen (Negativkontrolle) sowie mit 17- $\beta$ -Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) stimulierte Zellen.

**4.5.1.4. Zusammenfassende tabellarische Darstellung des MTT-Test**

Eine zusammenfassende Darstellung über die Wirkungen von 30 $\mu$ M und 1mM des Leinsamenrohextraktes auf die Endometriumzellkulturen Ishikawa, RL95-2 und MFE-280 im



MTT-Assay liefert die folgende Tabelle.

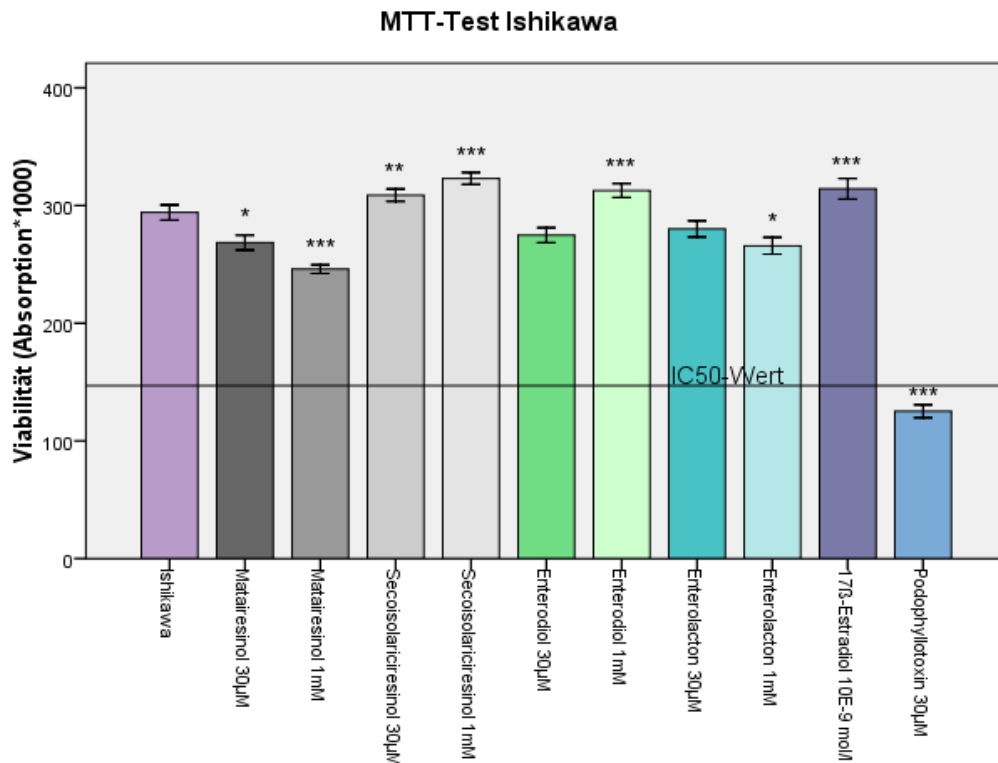
**Tab. 4 MTT-Test mit Leinsamenrohextrakt**

MTT-Assay	Ishikawa-Zellen	RL95-2-Zellen	MFE-280-Zellen
Leinsamenrohextrakt 30µM	↓***	↓n.s.	↓n.s.
Leinsamenrohextrakt 1mM	↑***	↑***	↑***

#### 4.5.2. MTT-Test mit Lignan

##### 4.5.2.1. MTT-Test Ishikawa

Um den Einfluss der Lignane auf die Viabilität der Ishikawa-Zellen zu testen, wurde der MTT-Test durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zeigten beide Konzentrationen Matairesinol eine signifikante Hemmwirkung von 8,73% ( $p < 0,05$ ) bei 30µM und um 16,36% ( $p < 0,001$ ) bei 1mM. Beide Konzentrationen Secoisolariciresinol zeigten eine signifikante Zunahme der Proliferation, wobei sich bei 30µM eine Zunahme der vitalen Zellen um 4,99% ( $p < 0,01$ ) und bei 1mM um 9,84% ( $p < 0,001$ ) präsentierte. Die niedrige Konzentration Enterodiol zeigte eine nicht signifikante Hemmwirkung um 6,57% ( $p = 0,182$ ), jedoch in der hohen Konzentration einen signifikanten Anstieg der Zellproliferation um 6,33% ( $p < 0,001$ ). Nach Exposition mit beiden Konzentrationen Enterolacton fiel die Zahl der vitalen Zellen, jedoch bei 30µM nicht signifikant um 4,76% ( $p = 0,439$ ) und bei 1mM signifikant um 9,63% ( $p < 0,05$ ). Eine Zytotoxizität der Lignane und ein entsprechender  $IC_{50}$ -Wert waren nicht feststellbar. Das als Positivkontrolle eingesetzte 17-β-Östradiol zeigte mit 6,84% eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Stimulation der Proliferationsrate. Bei Podophyllotoxin als Toxizitätskontrolle in der Konzentration von 30µM kam es zu einer signifikanten Hemmwirkung von 57,42% ( $p < 0,001$ ) auf die Zellproliferation. Ein  $IC_{50}$ -Wert und eine somit deutliche Toxizität ließen sich nur bei Podophyllotoxin nachweisen.



**Abb. 17 MTT-Test Ishikawa-Zellen mit den Lignan**

Einfluss auf die Viabilität der Ishikawa-Zellen nach 48h Stimulation mit den verwendeten Lignan in zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Vergleichsgruppen fungierten unstimulierte Ishikawa-Zellen (Negativkontrolle) sowie mit 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) stimulierte Zellen.

**Tab. 5 MTT-Test an Ishikawa**

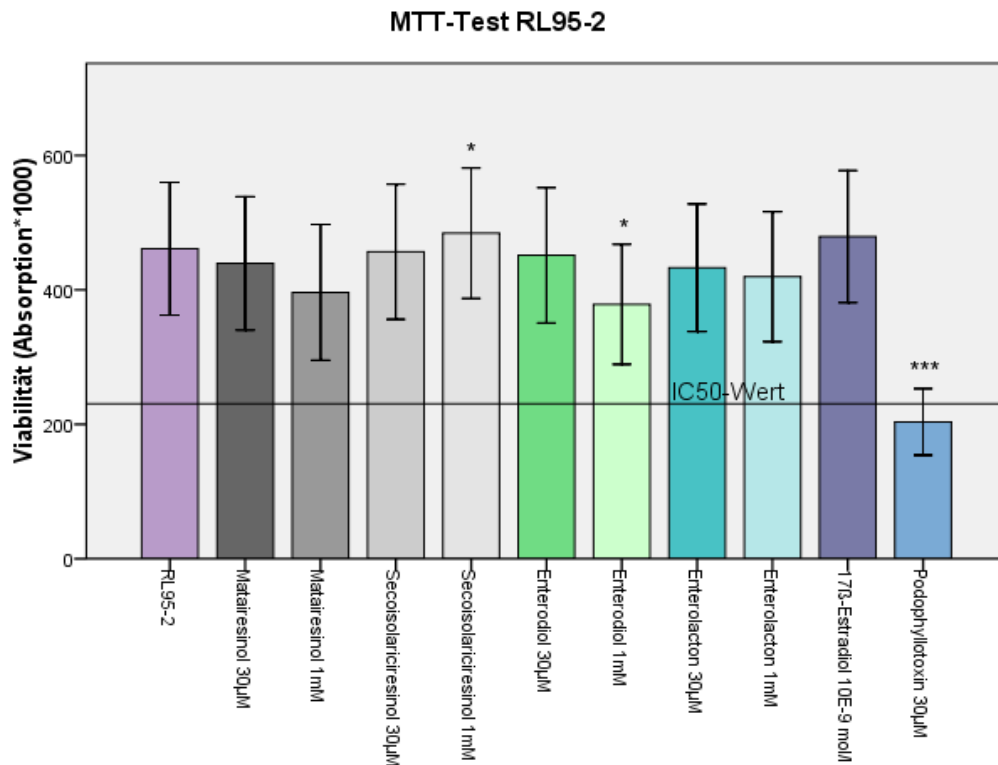
Übersicht über die Wirkungen der Lignane, sowie 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) auf die Endometriumzellkultur Ishikawa im MTT-Assay

MTT-Assay	Ishikawa-Zellen
Matairesinol 30µM	↓ *
Matairesinol 1mM	↓ ***
Secoisolariciresinol 30µM	↑ **
Secoisolariciresinol 1mM	↑ ***
Enterodiol 30µM	↓ n.s.
Enterodiol 1mM	↑ ***

Enterolacton 30µM	↓ n.s.
Enterolacton 1mM	↓ *
17-β-Östradiol (Positivkontrolle)	↑ ***
Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle)	↓ ***

#### 4.5.2.2. MTT-Test RL95-2

Der Einfluss der Lignane auf die Zelllebensfähigkeit der RL95-2-Zellen ist in Abbildung 18 dargestellt. Bei Matairesinol ließ sich bei beiden Konzentrationen eine nicht signifikante antiproliferative Wirkung feststellen, wobei die höhere Konzentration von 1mM eine deutlich stärkere Hemmwirkung von 14,1% ( $p=0,057$ ) als 30µM von 4,7% ( $p=0,519$ ) aufwies. Secoisolariciresinol zeigte eine nicht signifikante ( $p=0,117$ ) Abnahme der Proliferation um 1% in der Konzentration von 30µM. Als statistisch signifikant erwies sich die Wachstumsstimulation um 5,0% ( $p<0,05$ ) der höheren Konzentration von 1mM. Die niedrige Konzentration Enterodiol zeigte eine nicht signifikante Hemmwirkung um 2,1% ( $p=0,536$ ), jedoch in der hohen Konzentration einen signifikanten Abfall der Zellzahl um 17,9% ( $p<0,05$ ). Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hemmten beide Konzentrationen Enterolacton nicht signifikant die Zellzahl, wobei 30µM eine Abnahme der vitalen Zellen um 6,1% ( $p=0,548$ ) und 1mM um 9,0% ( $p=0,277$ ) präsentierte. Eine Zytotoxizität der Lignane und somit der  $IC_{50}$ -Wert waren nicht dokumentierbar. Die Wachstumsstimulation der Positivkontrolle 17-β-Östradiol erwies sich bei einer tendenziellen Stimulation von 4,0% ( $p=0,051$ ) als nicht signifikant. Bei der Toxizitätskontrolle Podophyllotoxin in der Konzentration von 30µM kam es zu einer signifikanten Hemmwirkung von 55,9% ( $p<0,001$ ). Der  $IC_{50}$ -Wert und die somit toxische Wirkung ließen sich nur bei Podophyllotoxin nachweisen.



**Abb. 18 MTT-Test RL95-2-Zellen mit den Lignanen**

Einfluss auf die Viabilität der RL95-2-Zellen nach 48h Stimulation mit den verwendeten Lignanen in zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Vergleichsgruppen fungierten unstimulierte RL95-2-Zellen (Negativkontrolle) sowie mit 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) stimulierte Zellen.

**Tab. 6 MTT-Test an RL95-2**

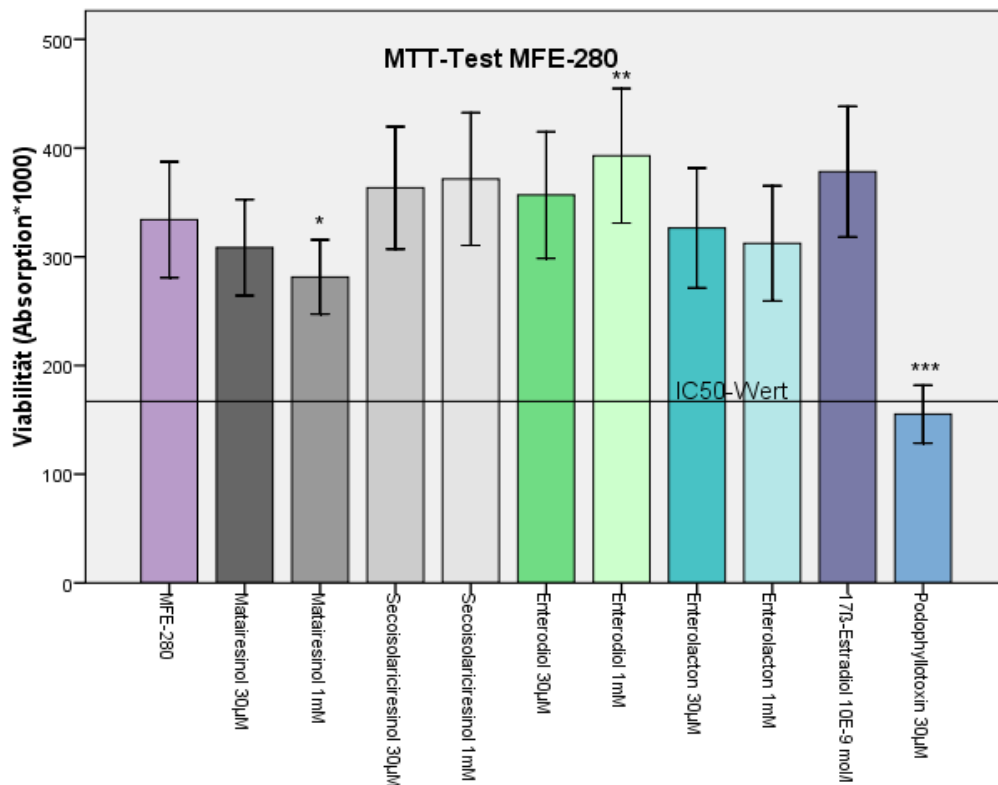
Übersicht über die Wirkungen der Lignane sowie 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) auf die Endometriumzellkultur RL95-2-Zellen im MTT-Assay

MTT-Assay	RL95-2-Zellen
Matairesinol 30µM	↓ n.s.
Matairesinol 1mM	↓ n.s.
Secoisolariciresinol 30µM	↓ n.s.
Secoisolariciresinol 1mM	↑ *
Enterodiol 30µM	↓ n.s.
Enterodiol 1mM	↓ *

Enterolacton 30µM	↓ n.s.
Enterolacton 1mM	↓ n.s.
17-β-Östradiol (Positivkontrolle)	↑ n.s.
Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle)	↓ ***

#### 4.5.2.3. MTT-Test MFE-280

Die Gesamtaktivität der MFE-280-Zellpopulation im MTT-Test nach Stimulation mit den Lignanenen ist in Abbildung 19 dargestellt. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zeigten beide Konzentrationen Matairesinol eine hemmende Wirkung. Dabei hemmte 30µM nicht signifikant um 7,67% ( $p=0,364$ ), jedoch 1mM signifikant um 15,77% ( $p<0,05$ ). Beide Konzentrationen Secoisolariciresinol zeigten eine nicht signifikante Zunahme der Proliferation. Secoisolariciresinol 30µM zeigte eine Zunahme der vitalen Zellen um 8,75% ( $p=0,301$ ) und 1mM um 11,18% ( $p=0,085$ ). Beide Konzentrationen Enterodiol zeigten einen Anstieg der Zellzahl, jedoch wies die hohe Konzentration von 1mM einen signifikanten Anstieg der vitalen Zellen um 17,6% ( $p<0,05$ ) und 30µM einen nicht signifikanten von 6,78% ( $p=0,369$ ) auf. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nahm bei beiden Konzentrationen Enterolacton die Zahl der avitalen Zellen nicht signifikant zu, wobei 30µM eine Zunahme um 2,3% ( $p=0,621$ ) und 1mM um 6,53% ( $p=0,215$ ) zeigten. Ein  $IC_{50}$ -Wert oder eine Zytotoxizität der Lignane konnte nicht ermittelt werden. Das als Positivkontrolle eingesetzte 17-β-Östradiol zeigte eine nicht signifikante Stimulation von 13,22% ( $p=0,062$ ) der Proliferation. Zu einer signifikanten Hemmwirkung von 53,54% ( $p<0,001$ ) auf die Viabilität der Tumorzellen kam es bei Podophyllotoxin in der Konzentration von 30µM. Einen  $IC_{50}$ -Wert und eine somit toxische Wirkung präsentierte nur das Podophyllotoxin.



**Abb. 19 MTT-Test MFE-280-Zellen mit den Lignanen**

Einfluss auf die Viabilität der MFE-280-Zellen nach 48h Stimulation mit den verwendeten Lignanen in zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Vergleichsgruppen fungierten unstimulierte MFE-280-Zellen (Negativkontrolle) sowie mit 17- $\beta$ -Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllo-toxin (Toxizitätskontrolle) stimulierte Zellen.

**Tab. 7 MTT-Test an MFE-280**

Übersicht über die Wirkungen der Lignane sowie 17- $\beta$ -Östradiol (Positivkontrolle) Podophyllo-toxin (Toxizitätskontrolle) auf die Endometriumzellkultur MFE-280-Zellen im MTT-Assay

MTT-Assay	MFE-280-Zellen
Matairesinol 30µM	↓ n.s.
Matairesinol 1mM	↓ *
Secoisolariciresinol 30µM	↑ n.s.
Secoisolariciresinol 1mM	↑ n.s.
Enterodiol 30µM	↑ n.s.
Enterodiol 1mM	↑ **

Enterolacton 30µM	↓ n.s.
Enterolacton 1mM	↓ n.s.
17-β-Östradiol (Positivkontrolle)	↑ n.s.
Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle)	↓ ***

#### 4.5.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse des MTT-Assay

Im Folgenden sind die gesamten Ergebnisse für den MTT-Test in einer Tabelle dargestellt. Sie gibt eine Übersicht über die Wirkungen von 30µM und 1mM des Leinsamenrohextraktes und der Lignane auf die Endometriumzellkulturen Ishikawa, RL95-2 und MFE-280 sowie 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) im MTT-Assay.

**Tab. 8 MTT-Test**

Übersicht über die Wirkungen von 30µM und 1mM des Leinsamenrohextraktes und der Lignane auf die Endometriumzellkulturen Ishikawa, RL95-2 und MFE-280 sowie 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) im MTT-Assay

<b>MTT-Assay</b>	<b>Ishikawa-Zellen</b>	<b>RL95-2-Zellen</b>	<b>MFE-280-Zellen</b>
Leinsamenrohextrakt 30µM	↓ ***	↓ n.s.	↓ n.s.
Leinsamenrohextrakt 1mM	↑ ***	↑ ***	↑ ***
Matairesinol 30µM	↓ *	↓ n.s.	↓ n.s.
Matairesinol 1mM	↓ ***	↓ n.s.	↓ *
Secoisolariciresinol 30µM	↑ **	↓ n.s.	↑ n.s.
Secoisolariciresinol 1mM	↑ ***	↑ *	↑ n.s.
Enterodiol 30µM	↓ n.s.	↓ n.s.	↑ n.s.
Enterodiol 1mM	↑ ***	↓ *	↑ **
Enterolacton 30µM	↓ n.s.	↓ n.s.	↓ n.s.
Enterolacton 1mM	↓ *	↓ n.s.	↓ n.s.
17-β-Östradiol (Positivkontrolle)	↑ ***	↑ n.s.	↑ n.s.
Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle)	↓ ***	↓ ***	↓ ***

## **4.6. Ergebnisse des BrdU-Assays**

Im Folgenden werden die Ergebnisse des BrdU-Assays nach 48h Stimulation mit dem Leinsamenrohextrakt, den Lignanen, dem Podophyllotoxin und dem 17- $\beta$ -Östradiol an den verwendeten Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa, RL95-2 und MFE-280 im Balkendiagramm und in tabellarischer Übersicht dargestellt. Statistisch signifikante Ergebnisse werden entsprechend gekennzeichnet. In den Diagrammen sind die Extinktionswerte als Maß der DNA-Neusyntheserate in Bezug zur jeweils verwendeten Probe dargestellt. Die Balken zeigen den Mittelwert der 16 gewonnenen Werte aus vier Experimenten  $\pm$  SD. Statistisch signifikante Ergebnisse werden entsprechend gekennzeichnet. Alle Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  wurden mit einem Sternchen (\*), bei  $p < 0,01$  mit zwei Sternchen (\*\*) und bei  $p < 0,001$  mit drei Sternchen (\*\*\*) gekennzeichnet. Als Maß der zytotoxischen Wirkung wurde der  $IC_{50}$ -Wert aus dem Säulendiagramm bestimmt. Der Wert repräsentiert die Konzentration der Verbindungen, bei der die Absorption, die direkt proportional zum gebildeten Formazanfarbstoff und damit auch zur Zellzahl ist, auf 50% der unbehandelten Vergleichsprobe gesunken ist. Der Leinsamenrohextrakt und die Lignane wurden jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen von 30  $\mu$ M und 1 mM untersucht. Die mitgeführten Kontrollen 17- $\beta$ -Östradiol wurden in einer Konzentration  $10E-9$  mol/l und Podophyllotoxin in einer Konzentration von 30  $\mu$ M angewandt.

Im BrdU-Assay wurde nach der Stimulation der Zellen dem Medium 5-Bromodeoxyuridin hinzugegeben, was bei proliferierenden Zellen in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird und sich nach immunzytochemischer Detektion quantifizieren lässt. Der  $IC_{50}$ -Wert, bei dem die Absorption auf 50% der Leerkontrolle sinkt, wurde aus dem Balkendiagramm bestimmt.

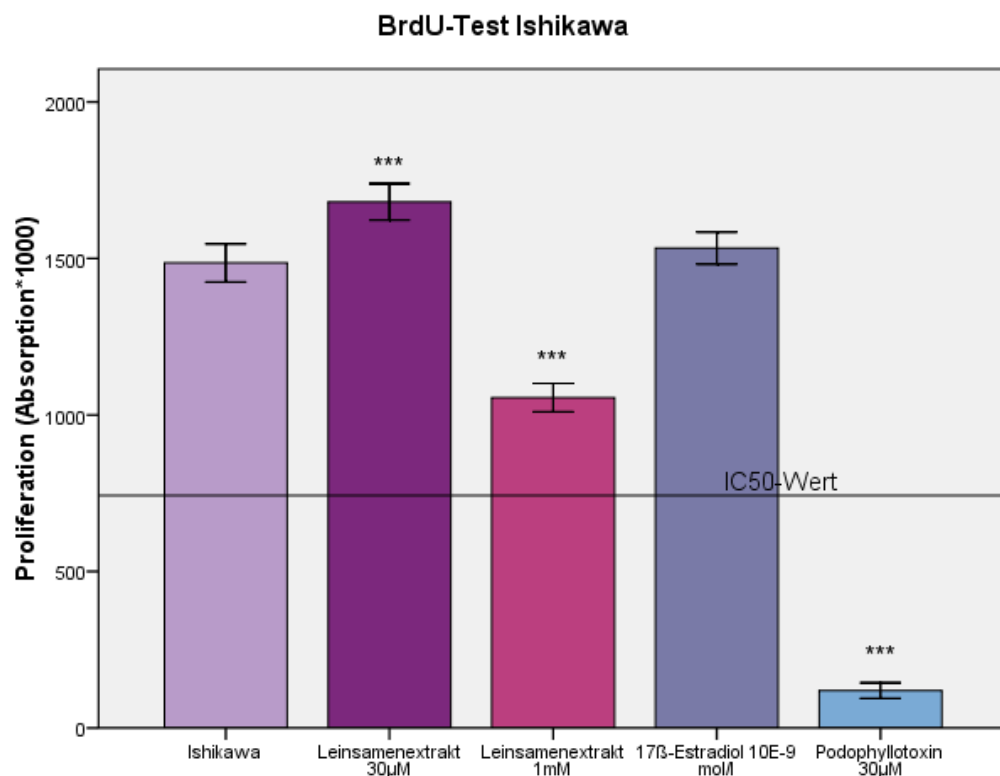
### **4.6.1. BrdU-Test mit Leinsamenrohextrakt**

#### **4.6.1.1. BrdU-Test Ishikawa**

Die Wirkung des Leinsamenrohextraktes im BrdU-Assay auf die Proliferation der Ishikawa-Zellen ist in Abbildung 20 dargestellt. Der Leinsamenrohextrakt zeigte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle in der niedrigen Konzentration von 30  $\mu$ M eine signi-



fikante Stimulation von 13,12% ( $p < 0,001$ ). In der höheren Konzentration war ein hemmender Einfluss von 28,97% ( $p < 0,001$ ) auf die Proliferation der Tumorzellen nachweisbar. Eine Zytotoxizität des Leinsamenrohextraktes und ein  $IC_{50}$ -Wert waren nicht feststellbar. Das als Positivkontrolle eingesetzte 17- $\beta$ -Östradiol zeigte eine nicht signifikante Stimulation von 3,71% ( $p = 0,090$ ) der Proliferationsrate. Bei Podophyllotoxin als Toxizitätskontrolle in der Konzentration 30  $\mu$ M kam es zu einer signifikanten Hemmung von 91,97% ( $p < 0,001$ ) auf die Zellproliferation.

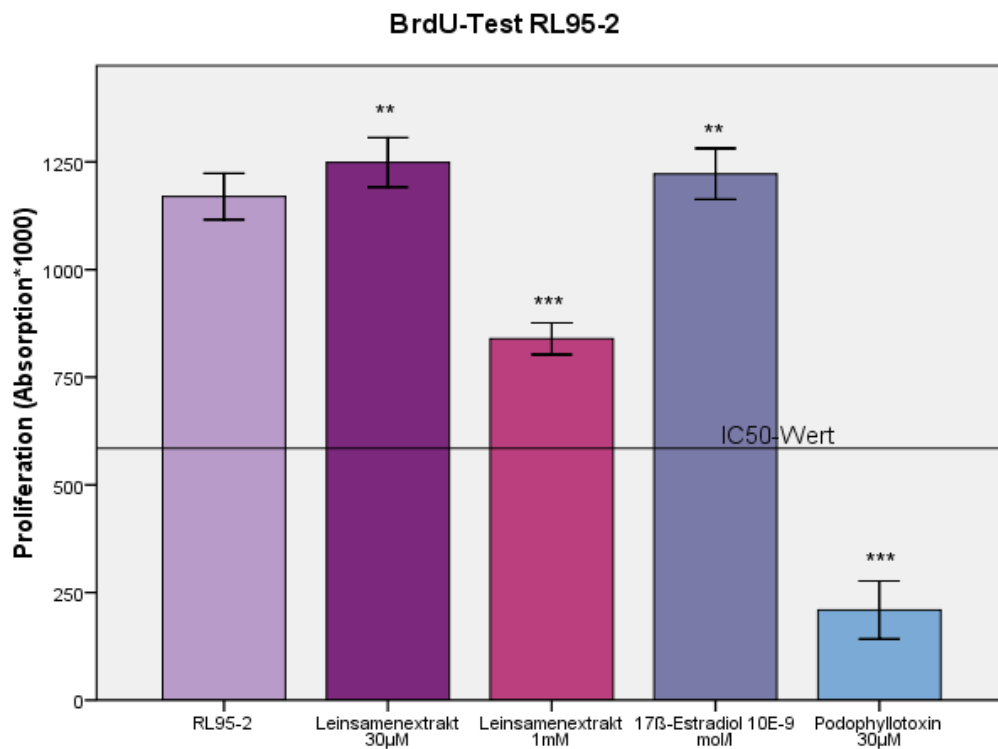


**Abb. 20 BrdU-Test Ishikawa mit Leinsamenrohextrakt**

Proliferationsrate der Ishikawa-Zellen nach 48h Stimulation mit Leinsamenrohextrakt in zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Vergleichsgruppen fungierten unstimulierte Ishikawa-Zellen (Negativkontrolle) sowie mit 17- $\beta$ -Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) stimulierte Zellen.

#### 4.6.1.2. BrdU-Test RL95-2

Der Einfluss des Leinsamenrohextraktes auf die Proliferation der RL95-2-Zellen ist in Abbildung 21 dargestellt. Die ermittelten Daten des BrdU-Assays zeigten, dass die niedrige Konzentration des Leinsamenrohextraktes im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine signifikante Stimulation von 6,77% ( $p < 0,01$ ) aufweist. In der höheren Konzentration war ein signifikant proliferationsinhibierender Effekt von 28,24% ( $p < 0,001$ ) nachweisbar. Ein  $IC_{50}$ -Wert oder eine Zytotoxizität konnte nicht ermittelt werden. Das als Positivkontrolle eingesetzte 17- $\beta$ -Östradiol zeigte eine signifikante Stimulation von 3,94% ( $p < 0,01$ ). Als Toxizitätskontrolle, mit einer Reduktion um 82,1%, wirkte 30  $\mu$ M Podophyllotoxin stark proliferationsinhibierend auf die Zellen ( $p < 0,001$ ).

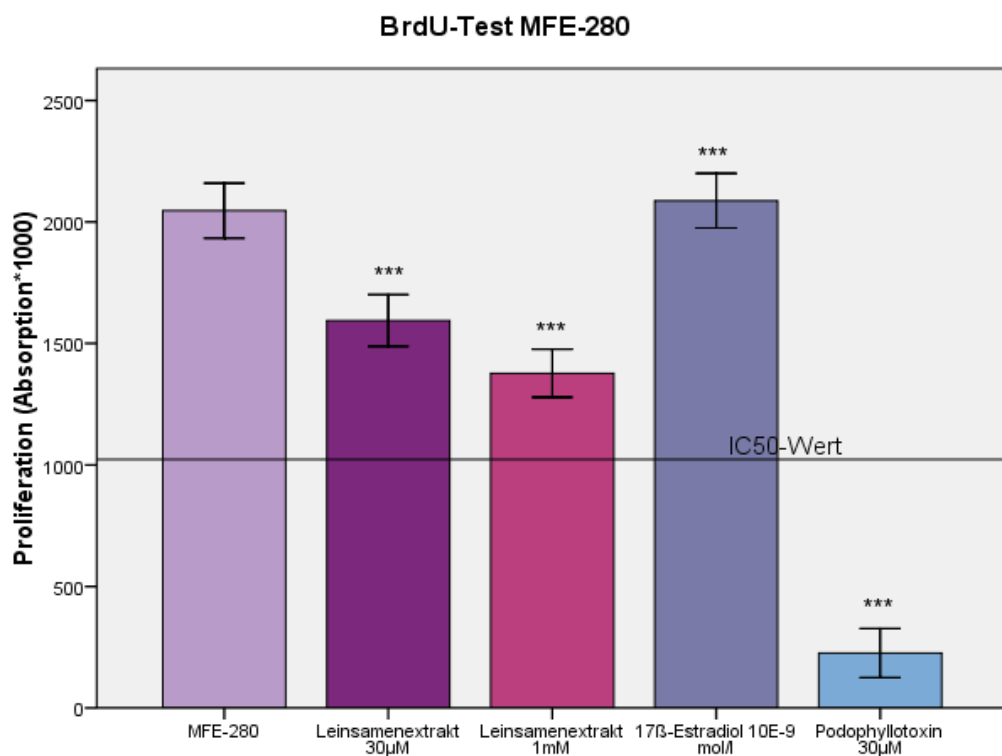


**Abb. 21 BrdU-Test RL95-2-Zellen mit Leinsamenrohextrakt**

Proliferationsrate der RL95-2-Zellen nach 48h Stimulation mit Leinsamenrohextrakt in zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Vergleichsgruppen fungierten unstimulierte RL95-2-Zellen (Negativkontrolle) sowie mit 17- $\beta$ -Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) stimulierte Zellen.

#### 4.6.1.3. BrdU-Test MFE-280

Die Proliferation der MFE-280-Zellen nach 48h Inkubation mit dem Leinsamenrohextrakt wird in Abbildung 22 dargestellt. Die niedrige Konzentration von 30µM hatte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle einen signifikant hemmenden Einfluss von 22,09% ( $p < 0,001$ ). In der höheren Konzentration war ebenfalls eine signifikante Hemmung von 32,70% nachweisbar ( $p < 0,001$ ). Eine Zytotoxizität und ein  $IC_{50}$ -Wert waren nicht feststellbar. 17-β-Östradiol bewirkte eine signifikante Stimulation der Proliferation von 2,01% ( $p < 0,001$ ). Podophyllotoxin hemmte in der Konzentration von 30µM um 88,95% ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 22 BrdU-Test MFE-280-Zellen mit Leinsamenrohextrakt**

Proliferationsrate der MFE-280-Zellen nach 48h Stimulation mit Leinsamenrohextrakt in zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Vergleichsgruppen fungierten unstimulierte MFE-280-Zellen (Negativkontrolle) sowie mit 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) stimulierte Zellen.

**Tab. 9 BrdU-Test mit Leinsamenrohextrakt**

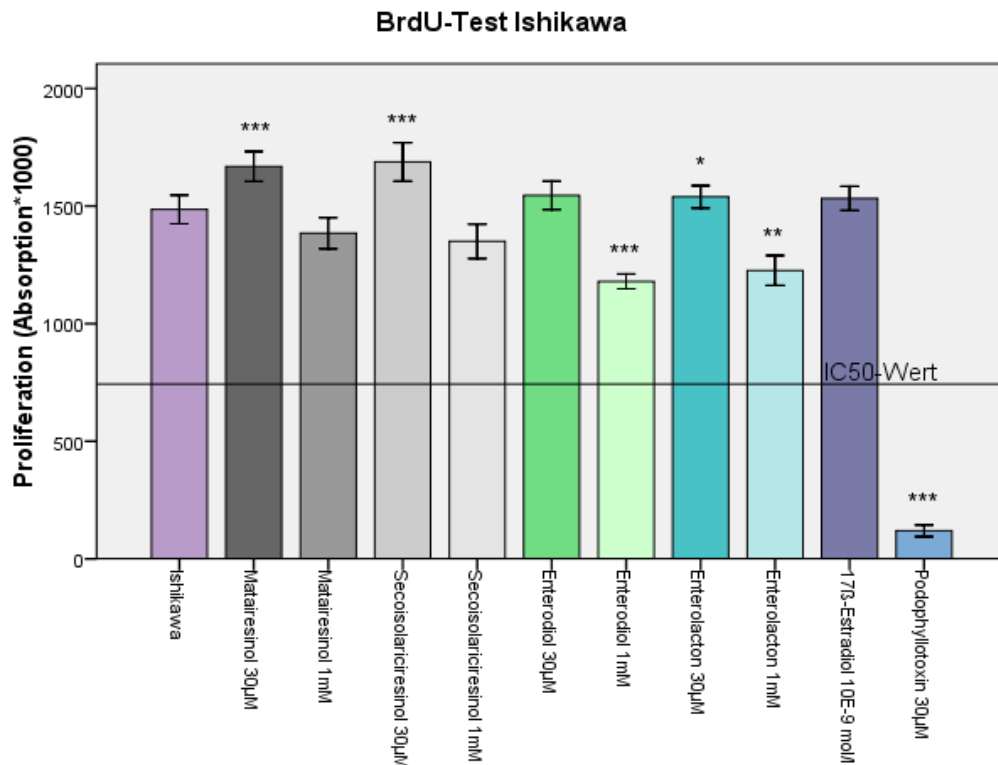
Übersicht über die Wirkungen von 30µM und 1mM des Leinsamenrohextraktes auf die Endometriumzellkulturen Ishikawa, RL95-2 und MFE-280im BrdU-Assay

BrdU-Assay	Ishikawa-Zellen	RL95-2-Zellen	MFE-280-Zellen
Leinsamenrohextrakt 30µM	↑***	↑**	↓***
Leinsamenrohextrakt 1mM	↓***	↓***	↓***

#### 4.6.2. BrdU-Test mit Lignan

##### 4.6.2.1. BrdU-Test Ishikawa

Die Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der Expositionsuntersuchungen des BrdU-Assays an der Ishikawa-Zellpopulation nach 48 Stunden Inkubation mit den Lignan. Die Testreihen erfolgten, um den Einfluss der Lignane auf die Proliferation der Zelllinie zu messen. In der Konzentration von 30µM zeigte Matairesinol einen signifikanten Proliferationsanstieg um 12,30% ( $p < 0,001$ ), jedoch in der Konzentration von 1mM einen nicht signifikanten Abfall von 6,81% ( $p = 0,461$ ). Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle präsentierte Secoisolariciresinol in der Konzentration von 30µM eine signifikante Zunahme um 13,6% ( $p < 0,001$ ) und 1mM eine nicht signifikante Abnahme der Zellen um 9,14% ( $p = 0,213$ ). Die Konzentration von 1mM Enterodiol zeigte eine signifikante Hemmwirkung um 20,61% ( $p < 0,001$ ) jedoch in der 30µM Konzentration einen nicht signifikanten Anstieg der Proliferation um 4,02% ( $p = 0,058$ ). Nach Exposition mit Enterolacton in der Konzentration von 30µM stieg die Proliferation signifikant um 3,59% ( $p < 0,05$ ) und fiel signifikant bei der höheren Konzentration von 1mM um 17,46% ( $p < 0,01$ ). Eine Zytotoxizität der Lignane war nicht feststellbar und somit kein  $IC_{50}$ -Wert ermittelbar, da diese die Konzentration der Lignane beschreibt, welche die Zellvitalität in vitro auf 50% der unstimulierten Kontrolle hemmt. Eine Stimulation durch 17-β-Östradiol konnte nicht signifikant mit 3,71% ( $p = 0,090$ ) verzeichnet werden. Bei Podophyllotoxin als Toxizitätskontrolle in der Konzentration von 30µM kam es zu einer signifikanten Hemmung von 91,97% ( $p < 0,001$ ) auf die Zellproliferation.



**Abb. 23 BrdU-Test Ishikawa-Zellen mit Lignan**

Proliferationsrate der Ishikawa-Zellen nach 48h Stimulation mit den verwendeten Lignan in zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Vergleichsgruppen fungierten unstimulierte Ishikawa-Zellen (Negativkontrolle) sowie mit 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) stimulierte Zellen.

**Tab. 10 BrdU-Test an Ishikawa**

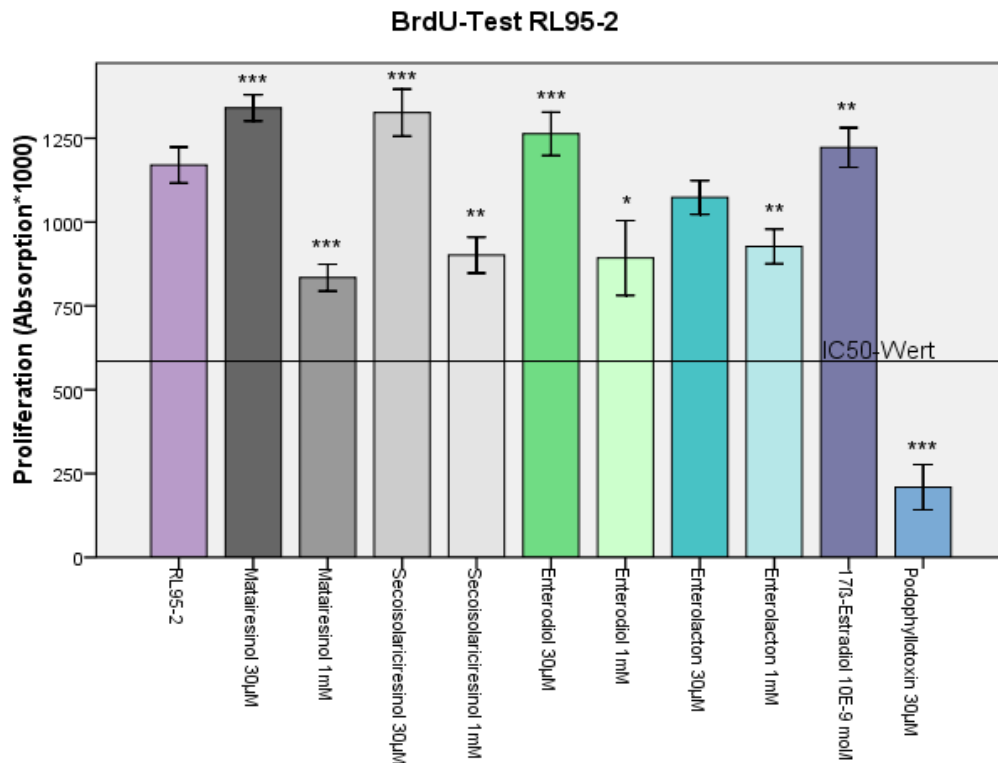
Übersicht über die Wirkungen der Lignane sowie 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) auf die Endometriumzellkultur Ishikawa im BrdU-Assay

BrdU-Assay	Ishikawa-Zellen
Matairesinol 30µM	↑***
Matairesinol 1mM	↓n.s.
Secoisolariciresinol 30µM	↑***
Secoisolariciresinol 1mM	↑n.s.
Enterodiol 30µM	↑n.s.
Enterodiol 1mM	↓***

Enterolacton 30µM	↑ *
Enterolacton 1mM	↓ **
17-β-Östradiol (Positivkontrolle)	↑ n.s.
Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle)	↓ ***

#### 4.6.2.2. BrdU-Test RL95-2

Der Einfluss der Lignane auf die Proliferation der RL95-2-Zellen ist in Abbildung 24 dargestellt. Die Ergebnisse des BrdU-Assays zeigten, dass die niedrige Konzentration von 30µM des Matairesinols eine signifikante proliferative Wirkung um 14,58% ( $p < 0,001$ ), jedoch in der hohen Konzentration eine signifikante antiproliferative Wirkung von 28,69% ( $p < 0,001$ ) hat. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zeigte die höhere Konzentration Secoisolariciresinol eine signifikante Hemmwirkung von 22,95% ( $p < 0,01$ ) und 30µM eine signifikante Zunahme der Proliferation um 13,38% ( $p < 0,001$ ). Die höhere Konzentration Enterodiol zeigte eine signifikante Hemmwirkung um 23,66% ( $p < 0,05$ ), jedoch in der niedrigeren Konzentration einen signifikanten Proliferationsanstieg um 7,97% ( $p < 0,001$ ). Beide Konzentrationen des Enterolacton zeigten eine Abnahme der Zellen, wobei 30µM eine nicht signifikante Abnahme um 8,24% ( $p = 0,247$ ) und 1mM eine signifikante Abnahme um 20,73% ( $p < 0,01$ ) zeigte. Ein  $IC_{50}$ -Wert oder eine Zytotoxizität der Lignane konnte nicht ermittelt werden. Das als Positivkontrolle eingesetzte 17-β-Östradiol zeigte eine signifikante Stimulation von 3,94% ( $p < 0,01$ ) auf die Proliferationsrate. Als Toxizitätskontrolle mit einer Reduktion um 82,1% wirkte 30µM Podophyllotoxin proliferationsinhibierend auf die Zellen ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 24 BrdU-Test RL95-2-Zellen mit Lignan**

Proliferationsrate der RL95-2-Zellen nach 48h Stimulation mit den verwendeten Lignan in zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Vergleichsgruppen fungierten unstimulierte RL95-2-Zellen (Negativkontrolle) sowie mit 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) stimulierte Zellen.

**Tab. 11 BrdU-Test an RL95-2**

Übersicht über die Wirkungen der Lignane sowie 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) auf die Endometriumzellkultur RL95-2 im BrdU-Assay

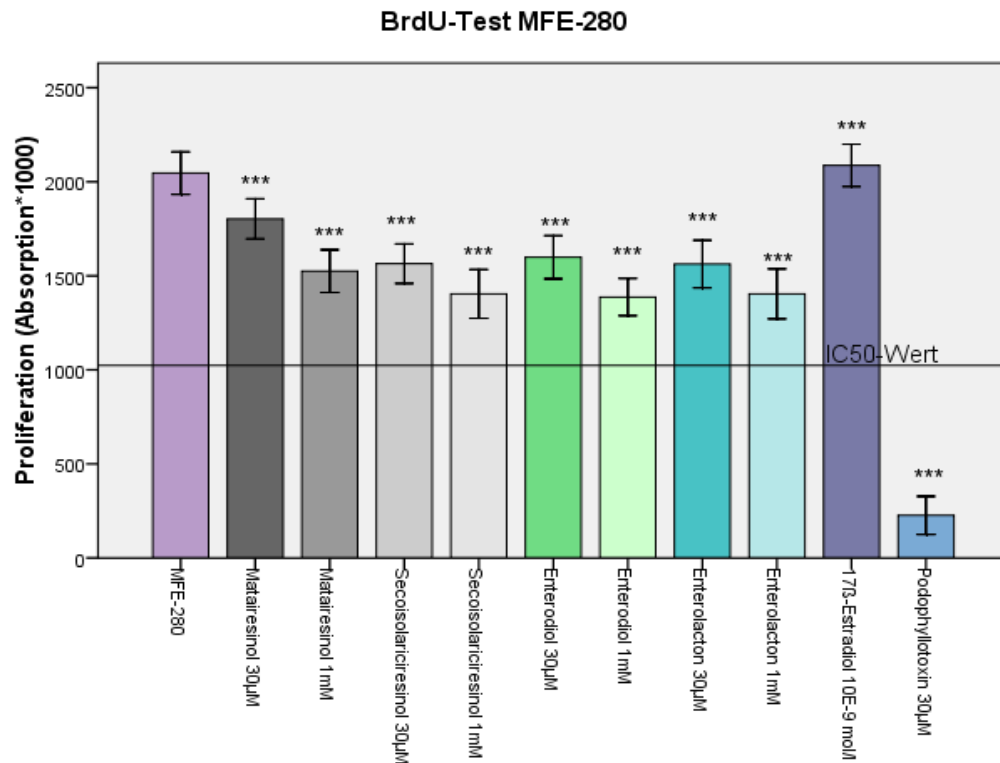
BrdU-Assay	RL95-2-Zellen
Matairesinol 30µM	↑***
Matairesinol 1mM	↓***
Secoisolariciresinol 30µM	↑***
Secoisolariciresinol 1mM	↓**
Enterodiol 30µM	↑***
Enterodiol 1mM	↓*
Enterolacton 30µM	↓n.s.

Enterolacton 1mM	↓**
17-β-Östradiol (Positivkontrolle)	↑**
Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle)	↓***

#### 4.6.2.3. BrdU-Test MFE-280

Die Proliferation der MFE-280-Zellen nach 48h Inkubation mit dem Leinsamenrohextrakt ist in Abbildung 25 dargestellt. Es ließ sich verdeutlichen, dass im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle alle Lignane in beiden Konzentrationen, 30µM und 1mM, eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Hemmwirkung zeigten. Im Nachstehenden werden die Lignane mit der Angabe der prozentuellen Hemmwirkung aufgelistet: Matairesinol 30µM um 11,9%, Matairesinol 1mM um 25,49%, Secoisolariciresinol 30µM um 23,54%, Secoisolariciresinol 1mM um 31,41%, Enterodiol 30µM um 23,66%, Enterodiol 1mM um 31,41%, Enterolacton 30µM um 21,87% und Enterolacton 1mM um 32,21%. Eine Zytotoxizität und somit der  $IC_{50}$ -Wert der Lignane waren nicht feststellbar. Das als Positivkontrolle eingesetzte 17-β-Östradiol erreichte eine signifikante Stimulation der Proliferation um 2,01% ( $p < 0,001$ ). Als signifikante Hemmung von 88,95% ( $p < 0,001$ ) auf die Zellproliferation war die Wirkung der Toxizitätskontrolle Podophyllotoxin in der Konzentration 30µM zu beurteilen.





**Abb. 25 BrdU-Test MFE-280-Zellen mit Lignan**

Proliferationsrate der MFE-280-Zellen nach 48h Stimulation mit den verwendeten Lignan in zwei verschiedenen Konzentrationen. Als Vergleichsgruppen fungierten unstimulierte MFE-280-Zellen (Negativkontrolle) sowie mit 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) stimulierte Zellen.

**Tab. 12 BrdU-Test an MFE-280**

Übersicht über die Wirkungen der Lignane sowie 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) auf die Endometriumzellkulturen MFE-280 im BrdU-Assay

BrdU-Assay	MFE-280-Zellen
Matairesinol 30µM	↓ ***
Matairesinol 1mM	↓ ***
Secoisolariciresinol 30µM	↓ ***
Secoisolariciresinol 1mM	↓ ***
Enterodiol 30µM	↓ ***
Enterodiol 1mM	↓ ***
Enterolacton 30µM	↓ ***

Enterolacton 1mM	↓***
17-β-Östradiol (Positivkontrolle)	↑***
Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle)	↓***

#### 4.6.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse des BrdU-Assay

Die folgende Tabelle stellt die gesamten Ergebnisse für den BrdU-Test dar und gibt so eine Übersicht über die Wirkungen von 30µM und 1mM des Rohextraktes und der Ligane auf die Endometriumzellkulturen Ishikawa, RL95-2 und MFE-280 sowie 17-β-Östradiol (Positivkontrolle) und Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle).

**Tab. 13 BrdU-Test**

<b>BrdU-Assay</b>	<b>Ishikawa-Zellen</b>	<b>RL95-2-Zellen</b>	<b>MFE-280-Zellen</b>
Leinsamenrohextrakt 30µM	↑***	↑**	↓***
Leinsamenrohextrakt 1mM	↓***	↓***	↓***
Matairesinol 30µM	↑***	↑***	↓***
Matairesinol 1mM	↓n.s.	↓***	↓***
Secoisolariciresinol 30µM	↑***	↑***	↓***
Secoisolariciresinol 1mM	↑n.s.	↓**	↓***
Enterodiol 30µM	↑n.s.	↑***	↓***
Enterodiol 1mM	↓***	↓*	↓***
Enterolacton 30µM	↑*	↓n.s.	↓***
Enterolacton 1mM	↓**	↓**	↓***
17-β-Östradiol (Positivkontrolle)	↑n.s.	↑**	↑***
Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle)	↓***	↓***	↓***

## 5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt, die in entsprechend vielen Einzelergebnissen mündete.

Um die Ergebnisse zu diskutieren, werden sie hier aufbereitet zusammengestellt und anhand folgender Kriterien diskutiert:

- Abhängigkeit vom Test
- Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit
- Abhängigkeit von der Zelllinie

Zur besseren Übersichtlichkeit wird das Design der vorliegenden Arbeit hier schematisch nochmals vorgestellt.

### 5.1. Zusammenstellung der Ergebnisse

In der Untersuchung wurden drei Zelllinien mit Leinsamenrohextrakt und Lignanen konfrontiert. Sowohl der Leinsamenrohextrakt als auch die Lignane wurden einem MTT-Test und ebenso einem BrdU-Test unterzogen. Die Umsetzung von MTT zu MTT-Formazan gilt als Maß für die metabolische Aktivität und den Redox-Status einer Zelle (147) und wird zur Quantifizierung der Zellproliferation, der Zellentwicklungsfähigkeit und zur Zytotoxizitätsbestimmung (148) genutzt. Der BrdU-Test ist ein colorimetrischer Immunoassay und misst den Einbau des Pyrimidinanalogons BrdU anstelle von Thymidin in die DNA. Mit einer vermehrten DNA-Synthese wird eine Zellproliferation erkennbar. In beiden Tests wird die Extinktion gemessen, sodass mit steigender Extinktion auch eine Zellproliferation angenommen wird und umgekehrt. Es wurden der Leinsamenrohextrakt und vier industriell hergestellte Lignane in jeweils zwei Molkonzentrationen getestet. Hinzu kommen mit dem 17- $\beta$ -Östradiol (Positivkontrolle) und dem Podophyllotoxin (Toxizitätskontrolle) zwei Testsubstanzen, die zur Überprüfung der Validität der Ergebnisse unabdingbar waren. Somit gibt es pro durchgeführtem Test jeweils drei karzinogene Zellkulturen: Ishikawa, RL95-2 und MFE-280, anhand welcher die Wirkung des Leinsamenrohextrakt, der insgesamt fünf Phytoöstrogene, die sich der Unterklasse der Lignane zuordnen lassen, und des Östrogens untersucht werden soll.

Den Gesamtüberblick über die Ergebnisse gibt die Tabelle 14, in der die Ergebnisse ge-

genübergestellt werden. Die Nennung beschränkt sich auf die signifikanten Ergebnisse.

**Tab. 14 Zusammenfassung der Ergebnisse der MTT- und BrdU-Tests**

Negative Werte zeigen eine Hemmung der Proliferation der Tumorzellen um den angegebenen Prozentsatz an, positive Werte eine Stimulation der Proliferation. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt angegeben: \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*  $p \leq 0,05$ .

Getestete Substanzen	Zelllinie		
MTT-Test	Ishikawa	RL95-2	MFE-280
Leinsamenrohextrakt 30µM	-15,19%***	n. s.	n. s.
Leinsamenrohextrakt 1mM	+22,46%***	+14,1%***	+26,66%***
Matairesinol 30µM	-8,73%*	n. s.	n. s.
Matairesinol 1mM	-16,36%***	n. s.	-15,77%*
Secoisolariciresinol 30µM	+4,99**	n. s.	n. s.
Secoisolariciresinol 1mM	+9,84***	+5,0%*	n. s.
Enterodiol 30µM	n. s.	n. s.	n. s.
Enterodiol 1mM	+6,33%***	-17,9%*	+17,6%**
Enterolacton 30µM	n. s.	n. s.	n. s.
Enterolacton 1mM	-9,63%*	n. s.	n. s.
17-β-Östradiol	+6,84%***	n. s.	n. s.
Podophyllotoxin	-57,42***	-55,9%***	-53,54***
BrdU-Test	Ishikawa	RL95-2	MFE-280
Leinsamenrohextrakt 30µM	+13,12%***	+6,77%**	-22,09%***
Leinsamenrohextrakt 1mM	-28,97%***	-28,24***	-32,70%***
Matairesinol 30µM	+12,3%***	+14,58***	-11,9%***
Matairesinol 1mM	n. s.	-28,69%***	-25,49%***
Secoisolariciresinol 30µM	+13,6%***	+13,38%***	-23,54%***
Secoisolariciresinol 1mM	n. s.	-22,95%**	-31,41%***
Enterodiol 30µM	n. s.	+7,97%***	-23,66%***
Enterodiol 1mM	-20,61***	-23,66%*	-31,41%***
Enterolacton 30µM	+3,59%*	n. s.	-21,87%***
Enterolacton 1mM	-17,46%**	-20,73%**	-32,21%***
17-β-Östradiol	n. s.	+3,94**	+2,01%***
Podophyllotoxin	-91,97%***	-82,1%***	-88,95%***

### 5.1.2. Intertestvalidität

Die Ergebnisse sind vom verwendeten Test abhängig. Entsprechend werden nun die Testergebnisse zusammengefasst. Besonderes Augenmerk wird auf die Übereinstimmung zwischen den beiden Tests gelegt. Hierzu wird ein Übereinstimmungsindex erstellt, bei dem es sich um einen summarischen Index handelt, der den Wert 1 erhält, wenn beide Tests übereinstimmende Ergebnisse aufweisen. Der Wert 0 zeigt an, wenn ein oder beide Tests keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten. Kommen beide Tests zu unterschiedlichen Ergebnissen, nimmt der Index den Wert -1 an. Tabelle 15 fasst das Ergebnis für die beiden Tests zusammen.

**Tab. 15 Intertest-Validität**

	<b>MTT-Test/BrdU-Test</b>
(1) Übereinstimmung	7 (19,4%)
(0) kein Ergebnis	21 (58,3%)
(-1) widersprüchliche Ergebnisse	8 (22,2%)
Insgesamt	36 (100%)

Tabelle 15 zeigt eine sehr geringe Intertest-Validität. Die Fälle, in denen beide Tests zu übereinstimmenden Ergebnissen kommen, sind mit 19,4% in der Minderheit und somit seltener als die Tests mit widersprüchlichen Ergebnissen. Die Mehrzahl der Fälle weist darüber hinaus in mindestens einem der beiden Tests keine signifikanten Ergebnisse vor. Insofern kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass sich die Intertest-Validität mit 19,4% als gering erweist. Auf der Grundlage der Ergebnisse kann gefolgert werden, dass:

- generell die Ergebnisse für den MTT-Test ungünstiger als für den BrdU-Test ausfallen.
- sich die für den MTT-Test erzielten Ergebnisse von denen für den BrdU-Test darin unterscheiden, dass 18 der 36 untersuchten Zusammenhänge für den MTT-Test ein statistisch signifikantes Ergebnis zeigen. Im BrdU-Test liegen 31 statis-

tisch signifikante Ergebnisse vor.

- Matairesinol in höherer Konzentration (1mM) einen hemmenden Effekt auf die Proliferation der Tumorzellen MFE-280 hat.
- sich Secoisolariciresinol in niedrigerer Konzentration (30µM) proliferierend auf die Tumorzellen Ishikawa auswirkt.
- Enterodiol in höherer Konzentration (1mM) einen hemmenden Effekt auf die Proliferation der Tumorzellen der Zelllinie RL95-2 hat.
- Enterolacton in höherer Konzentration (1mM) einen hemmenden Effekt auf die Proliferation der Tumorzellen der Zelllinie Ishikawa zeigt.
- Podophyllotoxin einen hemmenden Effekt auf die Proliferation aller Tumorzelllinien ausübt.

Als Klärungsansatz für die erhaltenen Ergebnisse bieten sich mehrere Möglichkeiten an, so z. B. die verschiedenen Ausgangsthesen dieser Tests. Der MTT-Test weist über das Redoxpotential indirekt die Glykolyse rate lebender Zellen nach, während der BrdU-Test zum Nachweis der DNA-Replikation von wachsenden Zellen verwendet wird. Der MTT-Test ist somit ein direkter Test, bei dem die Zellproliferation direkt über die Atmungsaktivität der Mitochondrien und somit die mitochondriale Aktivität bestimmt wird, während es beim BrdU-Test des Zwischenschrittes der Synthese von DNA bedarf und somit die Zellproliferationsaktivität bestimmt wird. Entsprechend fehleranfälliger sollte der BrdU-Test im Gegensatz zum MTT-Test sein. Dies ließ sich in unserer Arbeit nicht bestätigen. Auch die gegenwärtige Fachliteratur zeigt, dass sich besser reproduzierbare Ergebnisse für den BrdU-Test (149) erzielen lassen. Eine genaue Klärung dieser Ergebnisse können wir derzeit nicht geben. Zu diskutieren sind, ob ein direkter Einfluss der Proben auf die Mitochondrienfunktion über z.B. ER besteht und ob Mitochondrien dem Einfluss anderer Faktoren als die DNA unterliegen. Dies wird im Weiteren genauer erörtert.

### **5.1.3. Inter-Zelllinien-Validität**

Um die Inter-Zelllinien-Validität zu messen, wurde für die einzelnen Substanzen abermals ein additiver Index gebildet, um pro Substanz ein Maß der Konsistenz der gemess-

senen Wirkung bereitzustellen. Der Index nimmt den Wert 6 an, wenn die Substanz in allen drei Zelllinien und beiden Tests einen proliferierenden Effekt zeigt. Der Index nimmt den Wert -6 an, wenn die Substanz in allen drei Zelllinien und beiden Tests einen hemmenden Effekt aufwies. Bleibt die Substanz ohne Effekt, nimmt der Index den Wert 0 an. Die Besonderheit des Indexes besteht darin, dass sich widersprüchliche Ergebnisse auf die Magnitude auswirken. Hat sich beispielsweise eine Substanz in vier Tests als proliferierend erwiesen, wurde ihr der entsprechende Wert 4 zugeschrieben. Wurde aber in zwei Tests eine hemmende Wirkung gemessen, reduziert sich der Wert dieser um -2 auf den Gesamtwert 2. Nicht signifikante Ergebnisse werden mit dem Wert 0 berücksichtigt. Tabelle 16 stellt die Ergebnisse für den Index der Inter-Zelllinien-Validität dar.

**Tab. 16 Inter-Zelllinien-Validität**

<b>Zelllinie</b>	<b>Index der Inter-Zelllinien-Validität</b>
Leinsamenrohextrakt 30µM	0
Leinsamenrohextrakt 1mM	0
Matairesinol 30µM	0
Matairesinol 1mM	-4
Secoisolariciresinol 30µM	2
Secoisolariciresinol 1mM	0
Enterodiol 30µM	0
Enterodiol 1mM	-2
Enterolacton 30µM	0
Enterolacton 1mM	-4
17-β-Östradiol	3
Podophyllotoxin	-6

Die in Tabelle 16 zusammengestellten Ergebnisse können wie folgt gegenübergestellt werden:

- Die Kontrollsubstanz Podophyllotoxin erreicht den erwarteten Wert von -6, d.h., sie erweist sich in allen Tests als Zellgift.
- Die proliferierende Wirkung von 17-β-Östradiol ist dagegen nur eingeschränkt

gegeben, was auf nicht signifikante Messungen zurückzuführen ist.

- Die 30µM Konzentrationen von Leinsamenrohextrakt, Matairesinol, Enterodiol und Enterolacton haben keinen Effekt auf das Wachstum von Tumorzellen.
- 1mM Leinsamenrohextrakt übt keinen Effekt auf das Wachstum von Tumorzellen aus.
- 1mM Secoisolariciresinol zeigt keinen Effekt auf das Wachstum von Tumorzellen.
- Eine schwache bis mittlere hemmende Wirkung auf die Proliferation von Tumorzellen geht von Enterodiol, Enterolacton und Matairesinol in den 1mM Konzentrationen aus.
- Lediglich die 30µM Konzentration von Secoisolariciresinol wirkt sich schwach proliferierend auf Tumorzellen aus.

Damit ergeben sich weitgehend dieselben Ergebnisse, die bereits in den vorausgegangenen Kapiteln beschrieben wurden. Im Hinblick auf Leinsamenrohextrakt kann daher festgestellt werden, dass hemmende oder proliferierende Wirkungen auf Tumorzellen nicht valide nachgewiesen werden können. Valide nachweisen lassen sich hemmende Wirkungen für Enterodiol, Enterolacton und Matairesinol. Secoisolariciresinol wirkt sich schwach proliferierend auf Tumorzellen aus.

## **5.2. Die Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit**

Um die unterschiedlichen Effekte der Konzentration von Phytoöstrogenen auf Tumorzellen und Schlüsse auf die Wirksamkeit von Phytoöstrogenen sowie die Abhängigkeit der Wirksamkeit vom angewendeten Test ziehen zu können, fasst die Tabelle 17 die Ergebnisse hinsichtlich Effektrichtung für die beiden Tests und signifikanten Ergebnisse zusammen. Die leitende Frage der Untersuchung war dabei, ob sich unterschiedliche Konzentrationen desselben Phytoöstrogens ungleich auf die Zelllinien auswirken. Daraus könnte geschlossen werden, dass sich die Konzentration von Phytoöstrogenen auf die Proliferation oder Hemmung der Entwicklung entsprechender Tumorzellen auswirkt



**Tab. 17 Effektrichtung der unterschiedlichen Konzentrationen der Proben**

Die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen des Leinsamenrohextraktes, der Lignane sowie der Kontrollsubstanzen auf die Zelllinien

H=hemmend, P=proliferierend, n.s.= nicht signifikant

Test	MTT	BrdU	MTT	BrdU	MTT	BrdU
Zelllinie	Ishikawa	Ishikawa	RL95-2	RL95-2	MFE-280	MFE-280
Leinsamen-rohextrakt 30µM	<b>H</b>	<b>P</b>	n. s.	<b>P</b>	n.s.	H
Leinsamen-rohextrakt 1mM	<b>P</b>	<b>H</b>	P	<b>H</b>	P	H
Matairesinol30µM	H	P	n.s.	<b>P</b>	n.s.	H
Matairesinol 1mM	H	n.s.	n.s.	<b>H</b>	H	H
Secoisolariciresinol 30µM	P	P	n.s.	<b>P</b>	n.s.	H
Secoisolariciresinol 1mM	P	n.s.	P	<b>H</b>	n.s.	H
Enterodiol 30µM	n.s.	n.s.	n.s.	<b>P</b>	n.s.	H
Enterodiol 1mM	P	H	H	<b>H</b>	P	H
Enterolacton 30µM	n.s.	<b>P</b>	n.s.	n.s.	n.s.	H
Enterolacton 1mM	H	<b>H</b>	n.s.	H	n.s.	H
17-β-Östradiol	P	n.s.	n.s.	P	n.s.	P
Podophyllotoxin	H	H	H	H	H	H

Tabelle 17 zeigt sieben Fälle (**fett** gekennzeichnet), in denen sich die Konzentration des Teststoffs differenziert auf die Tumorzellen auswirkt. Dabei werden nur die Fälle betrachtet, in denen sich beide Testergebnisse für die jeweilige Substanz als signifikant erwiesen haben. Mit einer Ausnahme wirkt sich die geringere Konzentration proliferierend, die höhere Konzentration hingegen hemmend auf das Wachstum der Tumorzellen aus. Eine differenzierte Wirkung der Konzentration findet sich im BrdU-Test für die Zelllinie RL95-2 für den Leinsamenrohextrakt und die Lignane Matairesinol, Secoisolariciresinol und Enterodiol. Dies gilt ebenso für die Zelllinie Ishikawa im BrdU-Test. Demnach kann angenommen werden, dass sich eine geringe Konzentration der Substanzen proliferierend auf Tumorzellen eines Endometriumkarzinom auswirkt, während eine

höhere Konzentration hemmend auf das Wachstum von Tumorzellen wirkt. Das entspricht dem Postulat biphasischer Effekte (150-152), in denen niedrige Konzentrationen proliferierend, hohe dagegen antiproliferativ wirken. Ob dieses Ergebnis reliabel ist, kann indes erst nach weiteren Tests mit Bestimmtheit gesagt werden. Aber hier kann bereits festgestellt werden, dass sich Lignane konzentrationsabhängig differenziert auf die Zelllinien auswirken. Eine hemmende Wirkung ist dabei von hohen bzw. höheren Konzentration als 30µM zu erwarten. Beantwortet werden muss aber die Frage, wo die Trennlinie zwischen einer proliferierenden und einer hemmenden Wirkung verläuft. Die differenzierte Wirkung des Leinsamenrohextraktes auf die Zelllinie Ishikawa im MTT-Test kann an dieser Stelle nicht mit Bestimmtheit kommentiert werden und muss daher im Folgenden noch diskutiert werden.

### **5.3. Die Abhängigkeit von der Zelllinie**

Tabelle 14 kann auch als Grundlage dienen, um die Ergebnisse hinsichtlich der Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie zu diskutieren. Als Ergebnis kann Nachfolgendes festgehalten werden.

#### **5.3.1. Die Abhängigkeit von der Ishikawa-Zelllinie**

Für die Ishikawa-Zelllinie ergibt der Vergleich vom MTT-mit dem BrdU-Test diffuse Ergebnisse, die keine eindeutigen Schlüsse zulassen. Übereinstimmung zwischen den beiden Tests zeigt sich nur im Hinblick auf die proliferierende Wirkung der niedrigen Secoisolariciresinol- und die hemmende Wirkung der hohen Enterolactonkonzentration. Ansonsten differieren die Ergebnisse zwischen beiden Tests für die Ishikawa-Zelllinie: entweder wird bei einem Test eine proliferierende Wirkung oder bei dem anderen eine hemmende Wirkung ermittelt. Hinzukommt, dass ein Test eine signifikante, der andere eine nichtsignifikante Wirkung vorweist. Folglich sind die Ergebnisse ungeeignet, um einen Schluss auf die Ishikawa-Zelllinie und somit auf die Wirksamkeit der verwendeten Substanzen auf ein gut differenziertes endometriales Adenokarzinom zuzulassen.

### **5.3.2. Die Abhängigkeit von der RL95-2-Zelllinie**

Für die RL95-2-Zelllinie ergibt sich ein ähnliches Bild. Die Übereinstimmungen zwischen dem MTT- und BrdU-Test mit Blick auf die verwendeten Substanzen fallen nicht größer aus als für die Ishikawa-Testlinie. So scheint sich eine hemmende Wirkung von 1mM Enterodiol auf RL95-2 zu bestätigen. Jedoch steht diesem Ergebnis ein widersprüchliches Resultat für 1mM Secoisolariciresinol und 1mM Leinsamenrohextrakt entgegen: proliferierend im MTT-Test, hemmend im BrdU-Test. Abgerundet werden die Ergebnisse durch Test-Paare, in denen immer ein Test, in der Mehrzahl der Fälle der MTT-Test, ein nicht signifikantes Ergebnis hervorbringt. Er wurde bereits oben als ungünstig für die Messung geringer Konzentrationen eingestuft.

### **5.3.3. Die Abhängigkeit von der MFE-280-Zelllinie**

Für die MFE-280-Zelllinie ergibt sich basierend auf dem BrdU-Test ein einheitliches Bild: alle getesteten Substanzen wirken sich hemmend auf die Bildung von Tumorzellen aus. Der Vergleich der Ergebnisse des BrdU- mit denen des MTT-Tests zeigt aber, dass sich nur im Fall von 1mM Matairesinol eine hemmende Wirkung in beiden Tests nachweisen lässt. Dem widersprechen die Ergebnisse für Leinsamenrohextrakt (1mM) und Enterodiol (1mM). In beiden Fällen weist der MTT-Test die entsprechende Substanz als proliferierend auf Tumorzellen auf. Der BrdU-Test hingegen zeigt, dass dieselbe Substanz in derselben Konzentration (jeweils 1mM) hemmend auf Tumorzellen wirkt. Die Ergebnisse werden durch das mittlerweile bekannte Bild nicht signifikanter Ergebnisse für den MTT-Test, die vor allem geringe Konzentrationen betreffen, abgerundet. Die Ergebnisse verdeutlichen die Validitätsproblematik und die Nutzbarkeit des MTT-Tests.

Festgestellt werden kann, dass sich im BrdU-Test bezüglich der Zelllinien RL95 und Ishikawa für niedrige Konzentrationen eine proliferierende und für hohe Konzentrationen eine hemmende Wirkung nachweisen lassen. Es handelt sich also um einen biphasischen Effekt. Im BrdU-Test präsentieren sich für die Zelllinie MFE-280 signifikant hemmende Resultate bei sämtlichen untersuchten Substanzen.

Diese Ergebnisse werfen nun die Frage auf, ob der Differenzierungsgrad der Adenokarzinome einen Unterschied in der Wirksamkeit aufklären kann. Handelt es sich bei den Zelllinien RL95-2 und Ishikawa um gut bis mäßig differenzierte Zelllinien, so zeigt sich auch, dass die signifikanten Resultate in beiden Tests, bis auf eine Ausnahme (1mM Enterodiol im MTT-Test), übereinstimmen. Für die Zelllinie MFE-280, eine schlecht differenzierte Zelllinie, präsentieren sich die signifikanten Ergebnisse meist in Form hemmender Resultate für die Substanzen. Die Ausnahmen liegen beim Leinsamen und Enterodiol in der jeweils höheren Konzentration im MTT-Test. Somit könnte dem Differenzierungsgrad eine wesentliche Rolle zugeschrieben werden. Ob dieser für das unterschiedliche Verhalten verantwortlich ist wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein müssen.

Postuliert man nun, dass die Inkubationszeit, die in unserem Fall 48 Stunden betrug, die proliferative Wirkung deutlich beeinflusst, könnte eine mögliche Erklärung in dem nur für die Zelllinie RL95-2 vom Hersteller beschriebenen Oberflächenmikrovilli gefunden werden. Das heißt, die Zelle weist eine größere Oberfläche als die beiden anderen Zelllinien auf, sodass erhöhte Resorptionseigenschaften mit einer erhöhten intrazellulären Aufnahme und folgend auch erhöhten Konzentration der Lignane einhergehen können. Im Vergleich mit der Ziellinie MFE-280 zeigen sich deutliche Unterschiede im Proliferationsverhalten zwischen den Zelllinien. Vergleicht man jedoch die Ergebnisse der Zelllinien RL95-2 und Ishikawa sind alle signifikanten Ergebnisse der beiden Ziellinien identisch. Die genauen Veränderungen des Proliferationsverhaltens bei unterschiedlichen Inkubationszeiten sollten in Zukunft weiter untersucht werden.

Die Kontroverse um den Einfluss der Lignane auf die Tumorpheriferation von Endometriumkarzinomzelllinien lässt sich durch unsere Ergebnisse nicht beenden. Bei allen drei Zelllinien handelte es sich um ER-positive Tumorzellen. Um mögliche ER-unabhängige Wirkungen der Lignane zu erhalten, ist es in zukünftigen Arbeiten unabdingbar, ER-negative Zellreihe zu testen. Der Literaturvergleich (49, 153-155) bestätigt die gegenwärtige Uneinheitlichkeit von Ergebnissen bei Arbeiten mit Phytoöstrogenen.

#### **5.4. Die Abhängigkeit vom Lösungsmittel**

Grundsätzlich stellt sich die Frage nach der Konzentration vom Lösungsmittel und inwiefern an den Zellen ein adverser Effekt desselben stattfindet. Er muss daher in die Bewertungen mit einfließen. Dies wird auch in der Literatur (156, 157) diskutiert.

Um den adversen Effekt auszuschließen, wurde in unserer Arbeit 0,1% DMSO eingesetzt. DMSO zeigte sich als geeigneter Lösungsvermittler, da er in der Konzentration von 0,1 % an keiner Zelllinie eine unphysiologische Wirkung zeigte.

#### **5.5. Die Abhängigkeit vom FKS**

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Vergleichsuntersuchungen von gestripptem und nicht gestripptem FKS durchgeführt. Zur Abhängigkeit vom FKS kann daher keine Aussage getroffen werden. Die gegenwärtige Literatur belegt durchgängig die Vorteile des gestrippten FKS und empfiehlt demzufolge, das FKS zu strippten (158). Wir folgten diesem Urteil und strippten das Fetale Kälberserum für unsere Arbeiten.

#### **5.6. Interpretation der Ergebnisse**

##### **5.6.1. Interpretation der Ergebnisse nach Stimulation mit den Kontrollsubstanzen Podophyllotoxin und 17- $\beta$ -Östradiol**

Die Ergebnisse für die beiden Kontrollsubstanzen, 17- $\beta$ -Östradiol und Podophyllotoxin, entsprachen im Fall von Podophyllotoxin den Erwartungen. Podophyllotoxin wirkte bei allen Zelllinien hemmend auf das Wachstum von Tumorzellen. Dabei fiel die Wirkung im BrdU-Test nahezu doppelt so stark aus wie im MTT-Test. Als Maß der zytotoxischen Wirkung wurde der IC<sub>50</sub>-Wert gewählt und graphisch bestimmt. Das ist der Wert, bei dem die Absorption auf 50% der Kontrollsubstanz sinkt. Der IC<sub>50</sub>-Wert wurde im Falle von Podophyllotoxin erwartungsgemäß (159-163) in beiden Tests erreicht, bei 17- $\beta$ -Östradiol, ebenfalls wie erwartet (164), nicht.

Interessanterweise ergaben sich für 17- $\beta$ -Östradiol Ergebnisse, die die Validität der

Tests einzuschränken schienen: Während im MTT-Test 17- $\beta$ -Östradiol für die Zelllinie Ishikawa die vermutete signifikante Wirkung auf deren Proliferation hatte, war dies für den BrdU-Test bei der Zelllinie Ishikawa nicht der Fall. Entgegengesetzt präsentierten sich die Ergebnisse für die RL95-2 und die MFE-280 Zelllinie. Hier zeigten sich im BrdU-Test signifikant positive Wirkungen auf die Proliferation, allerdings nicht im MTT-Test. Es bleibt aber festzuhalten, dass 17- $\beta$ -Östradiol durchgehend eine proliferierende Wirkung auf alle Zelllinien ausübte, wenngleich nicht immer signifikant.

Möglicherweise bestand im MTT-Test auch kein direkter Zusammenhang zwischen der Zellzahl und den gemessenen Extinktionswerten. In seiner Promotionsarbeit an Ishikawa-Zelllinien zeigt Harald Esch (165), dass sich nach Inkubation mit 1nM E2 im Vergleich mit der Zellzahlentwicklung und der MTT-Formazan Extinktion nach 48 Stunden keine Veränderung der Extinktionswerte mehr ergaben. Nach 72 Stunden fielen indessen die Extinktionswerte, obwohl die gemessene Zellzahl konstant blieb. In folgenden Arbeiten sollte somit parallel zur MTT- und BrdU-Testung die elektronische Zählung der Zellzahlen durchgeführt werden, um die Frage der Korrelation zwischen Zellzahl und Extinktion beantworten zu können.

Auch der Inkubationszeit kann eine wesentliche Rolle zugeschrieben werden. Wir entschieden uns laborintern für die Inkubationszeit von 48 Stunden. Uns war bewusst, dass sich mit einer längeren Inkubationszeit die Ergebnisse möglicherweise anders präsentiert hätten. Östrogene üben über die ER nicht nur die klassische, genomische Wirkung einer modulierten Genexpression aus, es bestehen auch wesentlich schneller ablaufende, nichtgenomische Effekte (166-168). Diese haben ihren Ursprung an der Plasmamembran, funktionieren über intrazelluläre Signalkaskaden mit sehr schnellem Wirkungseintritt und können somit nicht durch Aktivierung von RNA und Proteinsynthese erklärt werden. Es wird postuliert, dass gynäkologischen Tumoren in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zukommt, da deren Proliferationen häufig unter östrogenem Einfluss stehen.

Bereits bekannt ist, dass die Östradiolwirkung durch einen mikrobiellen Befall der Zellkulturen beeinflusst werden kann (169) und Veränderungen dieser Art nicht immer erkennbar sind. Die Lagerung des Östradiols erfolgte während unserer Arbeit lichtge-

schützt und gekühlt, auch waren makroskopisch keinerlei Verschmutzungen, Ausfällungen oder ein mikrobieller Befall sichtbar. Alle zwei bis drei Tage überprüften wir dies. Zur Verhinderung von mikrobiellem Befall wurden Antibiotika und Antimykotika zugesetzt. Eine Verteilungsproblematik durch die ölige Östradiol-Substanz hätte ebenso vorliegen können. Es stellte sich hier ebenfalls die Frage nach der gewählten Konzentration. Die Östradiolkonzentration lag deutlich höher als unter In-vivo-Verhältnissen, so dass ein möglicher zytotoxischer Teileffekt und eine Östrogen-induzierte Apoptose denkbar gewesen wären (170-173). Bekannt ist auch, dass es bei Hormonüberschuss zu einer Downregulation der ER (174) kommt und somit eine verringerte Proliferation vorliegen kann. Liu et al. (175) zeigen, dass E2 proliferierend über den  $\alpha$ -Rezeptor und hemmend über den  $\beta$ -Rezeptor wirken kann. Dies kann zu einer möglichen Erklärung beitragen, wird ein dynamischer Rezeptorstatus postuliert. Weitere Ursachen sind in den Tumorzelllinien selbst zu suchen, welche auch Punktmutationen unterliegen mit daraus resultierender Hypo- oder Hypersensibilität bezüglich der Östrogenwirkung (176, 177).

Östrogen steuert unter physiologischen Bedingungen die Proliferation und Apoptose des Drüsenepithels des Endometriums, indem es die Expression einer Vielzahl von Genen in den Östrogen-abhängigen Epithelzellen reguliert (178). Sie stehen in Wechselwirkung mit multiplen Systemen, wie Protoonkogenen, Apoptose-Genen, Wachstumsfaktoren, Tumorsuppressorgenen, Zellzyklus-Regulatoren, Telomerasen und Mutatorgenen (179-181), welche die Proliferation und den Zellzyklus regulieren. Fehlfunktionen in diesen Systemen sind zu berücksichtigende Prozesse bei der Genese von Endometriumkarzinomen.

#### **5.6.2. Interpretation der Ergebnisse nach Stimulation mit dem Leinsamenrohextrakt und den Lignan**

Vorab sei angemerkt, dass der  $IC_{50}$ -Wert weder beim Leinsamenrohextrakt noch den Lignan in beiden Tests überschritten wurde, sodass keine zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden konnte. Jedoch ergaben sich in den Testreihen Unterschiede

zwischen dem MTT- und dem BrdU-Test bezüglich des Zelllinienverhaltens, für die eine Erklärung zu finden ist.

Der MTT-Test zeigt für beide Konzentrationen des Leinsamenrohextraktes mit der Zelllinie Ishikawa einen signifikanten Unterschied zur unstimulierten Kontrollgruppe. Eine geringe Konzentration von 30µM wirkte hemmend, während eine hohe Konzentration proliferierend wirkte. Beim Betrachten der beiden anderen Zelllinien im MTT-Test verhielt es sich ähnlich, wenn auch nicht für alle Konzentrationen signifikant. Der MTT-Test zeigte für die Konzentration von 1mM Leinsamenrohextrakt für RL95-2 und MFE-280 eine signifikant proliferierende Wirkung, während keine signifikante Wirkung in der niedrigen Konzentration festzustellen war. Dennoch blieb auch für diese Zelllinien eine hemmende Wirkung nachweisbar. Im Vergleich der Ergebnisse des Leinsamenrohextraktes im MTT-Test mit den industriell produzierten Lignanzen zeigten sich keine eindeutigen Ergebnisse. Einige Fälle bestätigten die Ergebnisse, andere widerlegten sie. Aus dem MTT-Test ließ sich daher schließen, dass der Leinsamenrohextrakt in erhöhter Konzentration das Wachstum von Endometriumkarzinomzellen fördert, während er in niedrigerer Konzentration das Wachstum an den Endometriumkarzinomzellen hemmt. Die nach den vorliegenden Ergebnissen gezogene Schlussfolgerung erweist sich jedoch als diskutabel, wenn die Ergebnisse des MTT-Tests mit den Ergebnissen des BrdU-Tests verglichen werden.

Die Unterschiede fanden sich im BrdU-Test nicht in der Form wieder wie im MTT-Test gezeigt. Beim Leinsamenrohextrakt präsentierten sich für die gut differenzierte Zelllinie Ishikawa und die mäßig differenzierte Zelllinie RL95-2 in der niedrigen Konzentration signifikant proliferierende Ergebnisse. Für die hohe Konzentration zeigten sich signifikant hemmende Wirkungen für beide Zelllinien. Für die schlecht differenzierte Zelllinie MFE-280 zeigten sich signifikant hemmende Resultate für beide Konzentrationen. Beim Vergleich der Ergebnisse des Leinsamenrohextraktes im BrdU-Test mit denen der kommerziell erworbenen Lignane ließen sich keine durchgehend eindeutigen Ergebnisse erzielen, jedoch bestätigten sie in den meisten Fällen die Resultate, die bereits beim Leinsamenrohextrakt festgestellt wurden.

Bei der Wirkungsweise von Phytoöstrogenen sind mannigfache Wirkmechanismen zu



berücksichtigen, welche zu diskrepanten Forschungsergebnissen führen können. Auch in der Literatur wird über die Exposition mit Phytoöstrogenen diskutiert. Einige Autoren dokumentierten eine Wachstumshemmung unter Lignaneinfluss (115, 131, 182). Andere hingegen wiesen bei In-vitro- und In-vivo-Studien (48), einer östrogenen Wirkung entsprechend, eine Proliferationssteigerung unter Exposition mit Phytoöstrogenen (183) oder Leinsamen (184) nach. Eine Studie von McMichael-Phillips et al. (185) untersuchte an 48 Frauen die Auswirkungen von Nahrungsergänzung mit 60 g Soja (enthält 45 mg Isoflavone) über 14 Tage auf die Proliferationsrate von prämenopausalen, histologisch normalen Brustepithelzellen und zeigte dass schon eine kurzfristige Nahrungsergänzung mit Soja die Proliferationsrate deutlich stimuliert.

Da die Expression einer Vielzahl von Genen in den östrogenabhängigen Epithelzellen reguliert wird, wurden sowohl für Östrogen als auch für pflanzliche Bestandteile (186, 187) apoptoseinduzierende Mechanismen beschrieben. Beider Apoptose Typ II, dem intrinsischen Weg der Apoptose, kommt es durch noch unbekannte Mechanismen zur Freisetzung des pro-apoptischen Faktors Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Dies geschieht sowohl in primären als auch Tumorzellen. An der Oberfläche verschiedener Tumorzelllinien findet man den CD95-Liganden (Fas Ligand), mit dem Tumor-infiltrierende Lymphozyten aktiv getötet werden. Die Anti-Tumor-Immunantwort wird dadurch unterdrückt. Dieses Phänomen wird Tumor Counterattack genannt. Poonyachoti et al. (188) untersuchten die Auswirkungen von Genistein, Daidzein und 17- $\beta$ -Östradiol auf Fas Ligand und Cytochrom c in primären Endometriumzellkulturen von Schweinen und RL95-2. Die Expression von Fas Ligand, die nur in RL95-2-Zellen vorhanden waren, wurde durch 17- $\beta$ -Östradiol, Daidzein oder Genistein signifikant hochreguliert und Cytochrom c in beiden Zellkulturen durch Genistein oder Daidzein gehemmt. 17- $\beta$ -Östradiol suppressierte Cytochrom c zwar in den primären Endometriumzellkulturen, jedoch nicht in RL95-2-Zellen. Die Ergebnisse der Autoren legen nahe, dass sowohl Östrogene als auch Phytoöstrogene Tumorprogression verursachen können.

Immer wieder werden biphasische Effekte unter Phytoöstrogenexposition beschrieben. Wang et al. (150) zeigten, dass niedrige Konzentrationen von 0,1 bis 10  $\mu$ M verschiede-

ner Phytoöstrogene die DNA-Synthese um 150 bis 235 % in humanen Brustkrebszellen erhöhte. Bei Konzentrationen von 20 bis 90  $\mu\text{M}$  dagegen fiel die Synthese antiproliferativ aus und reduzierte sich um 50 %. Auch Miodini et al. (150, 152) beschrieben einen biphasischen Effekt für Genistein an MCF -7-Zellen in einer Dosis von 5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$ . Aus dieser scheinbaren Ambivalenz zogen die Autoren den Schluss, dass eine positive bzw. negative Wirkung konzentrationsabhängig ist. Die Zellzahl oder DNA-Menge wurden jedoch nicht gemessen.

Auch Whitten et al. (189) bewerteten die potenziellen Vorteile und Risiken durch natürlich vorkommende pflanzliche Östrogene und wiesen nach, dass Coumestrol nicht dem Bild eines klassischen Antiöstrogen entspricht sondern durch steroidales Östrogen verstärkt ein uterines Wachstum bei Ratten induziert.

In einer Langzeitstudie konnten Unfer et al. (120) an gesunden Frauen im Klimakterium, welche entweder 150 mg einer Isoflavonmischung oder ein Placebo einnahmen, ein signifikant höheres Auftreten einer Endometriumhyperplasie in der Verumgruppe nachweisen, hingegen bei keiner der Patientinnen unter Placebo. Karzinome wurden jedoch nicht festgestellt.

Unsere Untersuchungen konnten die These einer tumorwachstumshemmenden Wirkung hoher Leinsamenrohextrakt-Konzentrationen zumindest anteilig bestätigen. Es ist aber anzumerken, dass der Leinsamenrohextrakt sowohl in höherer als auch in niedrigerer Konzentration das Wachstum von unterschiedlichen Zelllinien zur Proliferation bringen kann. Auch in der Literatur herrscht Uneinigkeit. Eine tatsächliche Festlegung einer repräsentativ hohen oder niedrigen Konzentration ist bisher nicht erfolgt (150, 152, 190).

Alle Arbeiten mit natürlichen Produkten unterliegen Schwankungen, die bei industriell hergestellten weitestgehend umgangen werden. Bei der Herstellung des Leinsamenrohextraktes konnte also eine inhomogene Rohextraktmasse entstehen, was an der unterschiedlichen Konfiguration liegt, z. B. Wachstumsvariabilität und damit einhergehende prozentuell unterschiedliche Inhaltsstoffe, mögliche Verschmutzungen oder Di-

cke der verschiedenen Materialien. Auch kann es zu einer mikrobiellen Besiedlung des Präparates kommen. Um den Einfluss auf die Ergebnisse zu reduzieren, erstellten wir für jeden durchgeführten Test eine neue Lösung. Somit haben wir in unserer Arbeit, wenngleich auch nur makroskopisch, diesen Einflussfaktor weitestgehend ausgeschaltet. Dies betraf, wie bereits erwähnt, auch die Lösungs- oder Verteilungsproblematik des Leinsamenrohextrakts.

Unsere Ergebnisse sowie der bisherige Forschungsstand lassen keine endgültige Aussage über die Wirksamkeit von Leinsamenrohextrakt auf das Wachstumsverhalten von Endometriumkarzinomzellen zu. Die klassische Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen den beiden Konzentrationen des Leinsamenrohextraktes und der Extinktionswerte als Maß der Tumorpheriferation war in unserer Arbeit nicht erkennbar. Dies betrifft ebenso die Ergebnisse mit den kommerziell erworbenen Lignanen. Deckungsgleich mit Literaturangaben, lieferten sie keine eindeutigen und einheitlichen Resultate.

## **5.7. Zusammenfassung und Ausblick**

Wie bereits im ersten Kapitel ausführlich beschrieben, war die leitende Frage dieser Arbeit, ob nach Stimulierung von humanen endometrialen Zellen mit einem Leinsamenrohextrakt und verschiedenen Lignanen ein Effekt auf die Zellen ausgeübt werden kann und ob es sich dann um einen proliferativen, hemmenden oder gar zytotoxischen Effekt handelt. Vergleichende Substanzen waren 17- $\beta$ -Östradiol und Podophyllotoxin. Bei Letztgenanntem wurde der toxische Effekt eindrücklich belegt, während der proliferative Effekt von 17- $\beta$ -Östradiol nicht in der erwartenden Stärke nachgewiesen werden konnte. Festgestellt wurde aber eine Proliferation.

Da im Verlauf dieser Arbeit umfangreiche Analysen durchgeführt wurden und somit eine entsprechend große Zahl an Einzelergebnissen vorliegt, musste die Validität der Resultate überprüft werden, um Aussagen über die Wirkung der eingesetzten Substanzen zu treffen. Die Ergebnisse dieser Validitätsprüfung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Der MTT-Test hat vor allem bei der Prüfung geringer Konzentrationen zu nicht

signifikanten Ergebnissen geführt.

- Für geringe Konzentrationen von 30µM der eingesetzten Substanzen können keine gesicherten Aussagen gemacht werden. Lediglich Secoisolariciresinol wirkte sich proliferierend auf Tumorzellen aus.
- Höhere Konzentrationen von 1mM ergaben in der Regel signifikante Effekte. Enterodiol, Enterolacton und Matairesinol hemmten das Tumorwachstum.

Letztlich kann aufgrund der Arbeitsergebnisse für Endometriumkarzinomzellen nicht bestätigt werden, dass die Aufnahme von Phytoöstrogenen in Form von Leinsamen grundsätzlich einen hemmenden Effekt auf die Zellproliferation hat. Es kann sich sogar gegenteilig auswirken. Positive Wirkungen auf die Proliferation von Tumorzellen zeigten dagegen vor allem Enterodiol, Enterolacton und Matairesinol. Damit werden die Arbeiten von Carreau et al. (191) für Enterodiol und Enterolacton und Milder et al. (192) für Matairesinol bestätigt. Die Frage einer möglichen Übertragbarkeit der In-vitro-Ergebnisse auf In-vivo-Verhältnisse muss unbeantwortet bleiben, weil viele divergierende Resultate vorliegen. Bevor also eine Indikation zur Einnahme oder gar konkrete Dosierung von Lignanen oder Leinsamenrohextrakt ausgesprochen werden, sollten sich dringend noch weitere Untersuchungen an die hier vorliegende anschließen. Unsere Ergebnisse zeigen teils deutliche proliferative Effekte und decken sich mit der Fachliteratur. Dies würde demzufolge ein Tumorwachstum fördern und somit verheerende Folgen für die Betroffenen haben.

Da Leinsamen viele bioaktive Verbindungen enthält, u.a. einen sehr hohen Gehalt an Lignan (193), vor allem in Form von SDG (194, 195), sollte in zukünftigen Arbeiten der Effekt von SDG gesondert geprüft werden.

Lignane haben in den letzten Jahren großes Interesse geweckt, allerdings mangelte es an der Kenntnis ihrer konkreten Wirkmechanismen. Die hier vorliegende Arbeit beweist einmal mehr, dass die öffentlich propagierte chemopräventive Wirkung der Phytoöstrogene (15, 196-198) nicht eindeutig nachgewiesen werden kann. Dies sollte die zukünftige Forschung berücksichtigen.

Eine ernährungsbedingte Belastung oder Zugabe von industriell hergestellten Phytoöstrogenen könnte sogar das Risiko für Tumorentstehung deutlich erhöhen. Daraus folgt, dass zum jetzigen Zeitpunkt keinerlei Empfehlungen zur Einnahme oder konkreten Dosierung ausgesprochen werden sollten.

Die gegenwärtige Datenlage (72, 199-205) erlaubt somit keine abschließende Beurteilung des Effektes von Lignanen und Leinsamen. Es ist nicht auszuschließen, dass z.B. für die Gruppe der postmenopausalen Frauen das bereits ohnehin bestehende Risiko einer gesteigerten Entwicklung präkanzerogener Veränderungen noch erhöht werden kann.

Mehrere Publikationen (32, 45) untermauern, dass ohne detaillierte Analysen molekularer Wirkungsmechanismen bekannter Phytoöstrogene eine Unterscheidung in endokrine Disruptoren, welche die Gesundheit schädigen können, und „gute“ Phytoöstrogene unmöglich ist.

Da in unserer Arbeit eindrücklich die hemmende Wirkung der Lignane auf die MFE-280-Zelllinie gezeigt werden konnte, sollten sich zukünftige Forschungsarbeiten aus unserer Sicht vor allem mit Enterodiol und Enterolacton und ihrer möglichen Antitumorwirkung an der Zelllinie MFE-280 beschäftigen.

## 6. Thesen

1. Die Inzidenz des Endometriumkarzinoms ist in westeuropäischen Regionen hoch. Das Endometriumkarzinom gehört in Deutschland zur vierthäufigsten Tumorerkrankung der Frau.
2. Östrogene sind Steroidhormone, welche für die Zellproliferation und Zelldifferenzierung im menschlichen Organismus wichtige Funktionen ausüben. Östrogene haben sowohl osteo-, kardio- als auch neuroprotektive Effekte, wirken jedoch auch thrombogen und können die Tumorzellproliferation stimulieren.
3. Vom menschlichen Organismus ist bekannt, dass eine Dauertherapie mit 17- $\beta$ -Östradiol über ER- $\alpha$  als auch ER- $\beta$  eine Hyperproliferation des Endometriums auslöst. Das Risiko der Entwicklung endometrialer Tumoren vergrößert sich dadurch.
4. Phytoöstrogene besitzen strukturelle Ähnlichkeit mit Östrogenen, die Hauptgruppen sind die Lignane, die Isoflavone, die Coumestane und die Stilbene. Als selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) können sie organspezifisch als Östrogen-Agonisten oder -Antagonisten wirken, wodurch eine östrogene oder auch antiöstrogene Wirkung erzielt werden kann.
5. Die am häufigsten untersuchten Phytoöstrogene sind Produkte der Sojabohne, welche reich an Isoflavonen sind. Lignane sind in europäischen Pflanzen, wie im Leinsamen, Vollkornprodukten oder Pflanzenölen, weit verbreitet und die quantitativ bedeutendere Nahrungsquelle der Europäer im Vergleich zu Soja.
6. In Asien lebende Frauen erkranken seltener an hormonabhängig wachsenden Tumoren, was mit der soja- und demzufolge phytoöstrogenreichen Ernährung zu begründen versucht wird. Diese Spekulation steigert das Interesse an Phytoöstrogenen, sodass die Industrie immer mehr entsprechende Produkte anbietet. Hiermit wächst aber gleichzeitig die Gefährdung der Betroffenen.
7. Phytoöstrogenhaltige Arzneimittel werden zur Therapie klimakterischer Beschwerden eingesetzt. Dies mag die Symptome dieser Lebensphase durchaus lindern, entbehrt aber eindeutiger Beweise über ihre Wirksamkeit. Hinzu kommt, dass auch mögliche Nebenwirkungen bisher mangelhaft bzw. gar nicht erforscht sind.
8. Der Einfluss der Phytoöstrogene auf das Endometriumkarzinom bleibt auch in der Forschung nach wie vor unklar. Weder In-vitro- noch In-vivo-Untersuchungen lieferten wissenschaftlich gesicherte Resultate.

9. In-vitro-Versuche an Tumorzelllinien zeigten einen biphasischen Effekt, der den Einfluss auf die Proliferation in Abhängigkeit von der Konzentration der Phytoöstrogene beschreibt.
10. Die Angaben, in welcher Konzentration Phytoöstrogene proliferativ oder inhibitorisch wirken, divergieren deutlich. So beobachteten Autoren eine Tumorzellstimulation in vitro schon bei Konzentrationen von 10 nM, bei Konzentrationen über 100 nM eine Tumorrogression. Andere Autoren hingegen konstatierten eine stimulierende Wirkung erst ab Konzentrationen zwischen 10 µM und 50 µM, darüberhinausgehende wirkten hemmend.
11. Ziel der Arbeit war es, die Eigenschaften von Lignanenen aus der einheimischen Pflanze Leinsamen an hormonabhängig wachsenden Endometriumkarzinomzelllinien zu untersuchen.
12. In der HPLC-MS-Analyse des Leinsamenrohextraktes wurde ein heterogenes Stoffgemisch aus verschiedenen Lignanenen und Isoflavonen detektiert.
13. Der Leinsamenrohextrakt und die getesteten Lignane wirken nicht zytotoxisch. Das Podophyllotoxin ist erwartungsgemäß zytotoxisch.
14. Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein biologisch wirksames Leinsamenrohextrakt hergestellt, welches abhängig von der Konzentration und dem Wirkmechanismus proliferationshemmende, aber auch -stimulierende Wirkung auf Östrogenrezeptor-positive Tumorzellen ausüben kann.
15. Es zeigte sich, dass die synthetisch hergestellten Lignane eine teilweise proliferationshemmende Wirkung ausübten, aber konzentrationsabhängig auch in der Lage waren, die Tumorzellproliferation zu fördern.
16. Eine Übertragbarkeit von In-vitro-Systemen auf In-vivo-Verhältnisse ist bei aktuell gegebener Datenlage noch nicht möglich.
17. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Supplementierung von Phytoöstrogenen mit Vorsicht betrachtet werden muss. Weitere Untersuchungen zu Auswirkungen einzelner Phytoöstrogene auf den menschlichen Organismus müssen sich notwendig anschließen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Schiebler TH, Korf H-W. Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. 10. Auflage ed: Steinkopff Verlag; 2007.
2. Kos Hv. 460-370 v. Chr.
3. Eden J. Phytoestrogens and the menopause. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1998 Dec;12(4):581-7.
4. Washburn S, Burke GL, Morgan T, Anthony M. Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause.* 1999 Spring;6(1):7-13.
5. Villa P, Costantini B, Suriano R, Perri C, Macri F, Ricciardi L, Panunzi S, Lanzone A. The differential effect of the phytoestrogen genistein on cardiovascular risk factors in postmenopausal women: relationship with the metabolic status. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Feb;94(2):552-8.
6. Yang G, Shu XO, Li H, Chow WH, Cai H, Zhang X, Gao YT, Zheng W. Prospective cohort study of soy food intake and colorectal cancer risk in women. *Am J Clin Nutr.* 2009 Feb;89(2):577-83.
7. Molla MD, Hidalgo-Mora JJ, Soteras MG. Phytotherapy as alternative to hormone replacement therapy. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011;3:191-204.
8. Colacurci N, Zarcone R, Borrelli A, De Franciscis P, Fortunato N, Cirillo M, Fornaro F. Effects of soy isoflavones on menopausal neurovegetative symptoms. *Minerva Ginecol.* 2004 Oct;56(5):407-12.
9. Colacurci N, Chiantera A, Fornaro F, de Novellis V, Manzella D, Arciello A, Chiantera V, Improta L, Paolisso G. Effects of soy isoflavones on endothelial function in healthy postmenopausal women. *Menopause.* 2005 May-Jun;12(3):299-307.
10. Shu XO, Jin F, Dai Q, Wen W, Potter JD, Kushi LH, Ruan Z, Gao YT, Zheng W. Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 May;10(5):483-8.
11. Goodman MT, Wilkens LR, Hankin JH, Lyu LC, Wu AH, Kolonel LN. Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer. *Am J Epidemiol.* 1997 Aug 15;146(4):294-306.
12. Sian MS. Diet and nutritional factors in the aetiology of colon cancer (review). *Anticancer Res.* 1987 May-Jun;7(3 Pt A):293-300.
13. Liu X, Suzuki N, Santosh Laxmi YR, Okamoto Y, Shibutani S. Anti-breast cancer potential of daidzein in rodents. *Life Sci.* 2012 Oct 5;91(11-12):415-9.
14. Nagata C. Ecological study of the association between soy product intake and mortality from cancer and heart disease in Japan. *Int J Epidemiol.* 2000 Oct;29(5):832-6.
15. Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer.* 1991 Jun;63(6):963-6.
16. Wogan GN. Diet and nutrition as risk factors for cancer. *Princess Takamatsu Symp.* 1985;16:3-



- 10.
17. Dunn JE, Jr. Breast cancer among American Japanese in the San Francisco Bay area. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1977 Dec;47:157-60.
18. Tsugane S. [Human ecological and epidemiological studies of Japanese immigrants and their descendants in South America]. *Nihon Eiseigaku Zasshi.* 1992 Oct;47(4):775-84.
19. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, Wu-Williams AH, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF, Hyer MB. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Nov 17;85(22):1819-27.
20. Jain RV, Mills PK, Parikh-Patel A. Cancer incidence in the south Asian population of California, 1988-2000. *J Carcinog.* 2005 Nov 10;4:21.
21. Wu AH, Ziegler RG, Horn-Ross PL, Nomura AM, West DW, Kolonel LN, Rosenthal JF, Hoover RN, Pike MC. Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996 Nov;5(11):901-6.
22. Wu AH, Wan P, Hankin J, Tseng CC, Yu MC, Pike MC. Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Carcinogenesis.* 2002 Sep;23(9):1491-6.
23. Olsen A, Christensen J, Knudsen KE, Johnsen NF, Overvad K, Tjønneland A. Prediagnostic plasma enterolactone levels and mortality among women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Aug;128(3):883-9.
24. Knight DC, Eden JA. Phytoestrogens--a short review. *Maturitas.* 1995 Nov;22(3):167-75.
25. Stephens FO. Breast cancer: aetiological factors and associations (a possible protective role of phytoestrogens). *Aust N Z J Surg.* 1997 Nov;67(11):755-60.
26. Stephens FO. The rising incidence of breast cancer in women and prostate cancer in men. Dietary influences: a possible preventive role for nature's sex hormone modifiers - the phytoestrogens (review). *Oncol Rep.* 1999 Jul-Aug;6(4):865-70.
27. Bouker KB, Hilakivi-Clarke L. Genistein: does it prevent or promote breast cancer? *Environ Health Perspect.* 2000 Aug;108(8):701-8.
28. Pendleton JM, Tan WW, Anai S, Chang M, Hou W, Shiverick KT, Rosser CJ. Phase II trial of isoflavone in prostate-specific antigen recurrent prostate cancer after previous local therapy. *BMC Cancer.* 2008;8:132.
29. Shahin AY, Ismail AM, Zahran KM, Makhoulf AM. Adding phytoestrogens to clomiphene induction in unexplained infertility patients--a randomized trial. *Reprod Biomed Online.* 2008 Apr;16(4):580-8.
30. Tempfer CB, Bentz EK, Leodolter S, Tscherne G, Reuss F, Cross HS, Huber JC. Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature. *Fertil Steril.* 2007 Jun;87(6):1243-9.
31. Simbalista RL, Sauerbronn AV, Aldrich JM, Areas JA. Consumption of a flaxseed-rich food is not more effective than a placebo in alleviating the climacteric symptoms of postmenopausal women.

J Nutr. 2010 Feb;140(2):293-7.

32. Vollmer G, Starcke S, Wober J, Zierau O. Endocrine modulation and the fragile balance of homeostasis--an overview. *Neuro Endocrinol Lett*. 2002 Jul;23 Suppl 2:37-42.
33. Cline JM, Wood CE. Estrogen/isoflavone interactions in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Am J Primatol*. 2009 Sep;71(9):722-31.
34. Gaete L, Tchernitchin AN, Bustamante R, Villena J, Lemus I, Gidekel M, Cabrera G, Carrillo O. Genistein selectively inhibits estrogen-induced cell proliferation and other responses to hormone stimulation in the prepubertal rat uterus. *J Med Food*. 2011 Dec;14(12):1597-603.
35. Diel P, Hertrampf T, Seibel J, Laudenbach-Leschowsky U, Kolba S, Vollmer G. Combinatorial effects of the phytoestrogen genistein and of estradiol in uterus and liver of female Wistar rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006 Dec;102(1-5):60-70.
36. Zhang Y, Chen WF, Lai WP, Wong MS. Soy isoflavones and their bone protective effects. *Inflammopharmacology*. 2008 Oct;16(5):213-5.
37. Johnsen NF, Olsen A, Thomsen BL, Christensen J, Egeberg R, Bach Knudsen KE, Loft S, Overvad K, Tjonneland A. Plasma enterolactone and risk of colon and rectal cancer in a case-cohort study of Danish men and women. *Cancer Causes Control*. 2010 Jan;21(1):153-62.
38. Goldwyn S, Lazinsky A, Wei H. Promotion of health by soy isoflavones: efficacy, benefit and safety concerns. *Drug Metabol Drug Interact*. 2000;17(1-4):261-89.
39. Barnes S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr*. 1995 Mar;125(3 Suppl):777S-83S.
40. Dabrosin C, Chen J, Wang L, Thompson LU. Flaxseed inhibits metastasis and decreases extracellular vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts. *Cancer Lett*. 2002 Nov 8;185(1):31-7.
41. Zierau O, Kretzschmar G, Moller F, Weigt C, Vollmer G. Time dependency of uterine effects of naringenin type phytoestrogens in vivo. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 Nov 6;294(1-2):92-9.
42. Phytoestrogens and endometrial hyperplasia. *Prescrire Int*. 2006 Apr;15(82):62-3.
43. Persky V, Van Horn L. Epidemiology of soy and cancer: perspectives and directions. *J Nutr*. 1995 Mar;125(3 Suppl):709S-12S.
44. Rose DP. Diet, hormones, and cancer. *Annu Rev Public Health*. 1993;14:1-17.
45. Moutsatsou P. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones (Athens)*. 2007 Jul-Sep;6(3):173-93.
46. Aidoo A, Bishop ME, Shelton SD, Lyn-Cook LE, Chen T, Manjanatha MG. Effects of daidzein, genistein, and 17beta-estradiol on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mutagenicity and uterine dysplasia in ovariectomized rats. *Nutr Cancer*. 2005;53(1):82-90.
47. Diel P, Smolnikar K, Schulz T, Laudenbach-Leschowski U, Michna H, Vollmer G. Phytoestrogens and carcinogenesis-differential effects of genistein in experimental models of normal and malignant

rat endometrium. *Hum Reprod.* 2001 May;16(5):997-1006.

48. Johnson EB, Muto MG, Yanushpolsky EH, Mutter GL. Phytoestrogen supplementation and endometrial cancer. *Obstet Gynecol.* 2001 Nov;98(5 Pt 2):947-50.

49. Aarestrup J, Kyro C, Knudsen KE, Weiderpass E, Christensen J, Kristensen M, Wurtz AM, Johnsen NF, Overvad K, Tjønneland A, Olsen A. Plasma enterolactone and incidence of endometrial cancer in a case-cohort study of Danish women. *Br J Nutr.* 2013 Jun 28;109(12):2269-75.

50. Horn-Ross PL, John EM, Canchola AJ, Stewart SL, Lee MM. Phytoestrogen intake and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Aug 6;95(15):1158-64.

51. Zeleniuch-Jacquotte A, Lundin E, Micheli A, Koenig KL, Lenner P, Muti P, Shore RE, Johansson I, Krogh V, Lukanova A, Stattin P, Afanasyeva Y, Rinaldi S, Arslan AA, Kaaks R, Berrino F, Hallmans G, Toniolo P, Adlercreutz H. Circulating enterolactone and risk of endometrial cancer. *Int J Cancer.* 2006 Nov 15;119(10):2376-81.

52. Leidenberger F, Ortmann O, Strowitzki T. *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte.* 4. Auflage ed: Springer Verlag; 2009.

53. Allen E, Doisy E. An ovarian hormone: preliminary report on its localization, extraction and partial purification and action in test animals. *American Journal of Anatomy.* 1924;34:133-81.

54. Yen SSC, R. B. Jaffe und Editoren editor. *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management*  
Philadelphia: W.B. Saunders. ; 1991.

55. Green S, Walter P, Greene G, Krust A, Goffin C, Jensen E, Scrase G, Waterfield M, Chambon P. Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem.* 1986 Jan;24(1):77-83.

56. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 11;93(12):5925-30.

57. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Dec;82(12):4258-65.

58. Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med.* 1999 Aug;246(2):133-8.

59. Mueller SO, Korach KS. Mechanism of estrogen receptor mediated agonistic and antagonistic effects. *The Handbook of Environmental Chemistry.* Metzler M, editor. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2001.

60. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science.* 1997 Sep 5;277(5331):1508-10.

61. Kietz S, Thomsen JS, Matthews J, Pettersson K, Strom A, Gustafsson JA. The Ah receptor inhibits estrogen-induced estrogen receptor beta in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.*

2004 Jul 16;320(1):76-82.

62. van der Burg B, de Groot RP, Isbrucker L, Kruijer W, de Laat SW. Direct stimulation by estrogen of growth factor signal transduction pathways in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992 Sep;43(1-3):111-5.

63. Weisz A, Bresciani F. Estrogen regulation of proto-oncogenes coding for nuclear proteins. *Crit Rev Oncog.* 1993;4(4):361-88.

64. Levin ER, Pietras RJ. Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Apr;108(3):351-61.

65. Westin SN, Broaddus RR, Deng L, McCampbell A, Lu KH, Lacour RA, Milam MR, Urbauer DL, Mueller P, Pickar JH, Loose DS. Molecular clustering of endometrial carcinoma based on estrogen-induced gene expression. *Cancer Biol Ther.* 2009 Nov;8(22):2126-35.

66. Health NCIaSAatNlo. Last Updated: 10/31/2011. : Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/estrogenreceptors>.

67. Ochiai M, Watanabe M, Kushida H, Wakabayashi K, Sugimura T, Nagao M. DNA adduct formation, cell proliferation and aberrant crypt focus formation induced by PhIP in male and female rat colon with relevance to carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1996 Jan;17(1):95-8.

68. Gershbein LL. Action of estrogen and adrenocorticoids on adenocarcinoma induction by 1,2-dimethylhydrazine in male rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1993 Jul;81(1):117-20.

69. Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. Clinical review 92: Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Feb;83(2):297-303.

70. Cos P, De Bruyne T, Apers S, Vanden Berghe D, Pieters L, Vlietinck AJ. Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med.* 2003 Jul;69(7):589-99.

71. Limer JL, Speirs V. Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res.* 2004;6(3):119-27.

72. Baber R. Phytoestrogens and post reproductive health. *Maturitas.* 2010 Aug;66(4):344-9.

73. Davin LB, Lewis NG. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiol.* 2000 Jun;123(2):453-62.

74. Smeds AI, Eklund PC, Sjöholm RE, Willfor SM, Nishibe S, Deyama T, Holmbom BR. Quantification of a broad spectrum of lignans in cereals, oilseeds, and nuts. *J Agric Food Chem.* 2007 Feb 21;55(4):1337-46.

75. Thompson LU, Robb P, Serraino M, Cheung F. Mammalian lignan production from various foods. *Nutr Cancer.* 1991;16(1):43-52.

76. Lampe JW. Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J Nutr.* 2003 Mar;133 Suppl 3:956S-64S.

77. Eeckhaut E, Struijs K, Possemiers S, Vincken JP, Keukeleire DD, Verstraete W. Metabolism of the lignan macromolecule into enterolignans in the gastrointestinal lumen as determined in the

- simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *J Agric Food Chem*. 2008 Jun 25;56(12):4806-12.
78. Heinonen S, Nurmi T, Liukkonen K, Poutanen K, Wahala K, Deyama T, Nishibe S, Adlercreutz H. In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J Agric Food Chem*. 2001 Jul;49(7):3178-86.
  79. Adlercreutz H. Epidemiology of phytoestrogens. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1998 Dec;12(4):605-23.
  80. Setchell KD, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr*. 1999 Mar;129(3):758S-67S.
  81. Sung MK, Lautens M, Thompson LU. Mammalian lignans inhibit the growth of estrogen-independent human colon tumor cells. *Anticancer Res*. 1998 May-Jun;18(3A):1405-8.
  82. Nhan S, Anderson KE, Nagamani M, Grady JJ, Lu LJ. Effect of a soymilk supplement containing isoflavones on urinary F2 isoprostane levels in premenopausal women. *Nutr Cancer*. 2005;53(1):73-81.
  83. Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. Genistein, daidzein, and their .beta.-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993 1993/11/01;41(11):1961-7.
  84. Messina M, Messina V. Increasing use of soyfoods and their potential role in cancer prevention. *J Am Diet Assoc*. 1991 Jul;91(7):836-40.
  85. Buck K, Vrieling A, Zaineddin AK, Becker S, Husing A, Kaaks R, Linseisen J, Flesch-Janys D, Chang-Claude J. Serum enterolactone and prognosis of postmenopausal breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Oct 1;29(28):3730-8.
  86. Heyenga AG, Lucas J, Dewick P. Production of tumour-inhibitory lignans in callus cultures of *Podophyllum hexandrum*. *Plant Cell Reports*. 1990 1990/11/01;9(7):382-5.
  87. van der Schouw YT, de Kleijn MJ, Peeters PH, Grobbee DE. Phyto-oestrogens and cardiovascular disease risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2000 Jun;10(3):154-67.
  88. Vanharanta M, Voutilainen S, Rissanen TH, Adlercreutz H, Salonen JT. Risk of cardiovascular disease-related and all-cause death according to serum concentrations of enterolactone: Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Arch Intern Med*. 2003 May 12;163(9):1099-104.
  89. Atteritano M, Marini H, Minutoli L, Polito F, Bitto A, Altavilla D, Mazzaferro S, D'Anna R, Cannata ML, Gaudio A, Frisina A, Frisina N, Corrado F, Cancellieri F, Lubrano C, Bonaiuto M, Adamo EB, Squadrito F. Effects of the phytoestrogen genistein on some predictors of cardiovascular risk in osteopenic, postmenopausal women: a two-year randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Aug;92(8):3068-75.
  90. Imbert TF. Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie*. 1998 Mar;80(3):207-22.
  91. Arroo RRJ, Alfermann AW, Medarde M, Petersen M, Pras N, Woolley JG. Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans. *Phytochemistry Reviews*. 2002 2002/01/01;1(1):27-35.

92. Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin Transl Oncol*. 2007 Dec;9(12):767-76.
93. Bjorge T, Trope C. [Hormone replacement therapy and cancer]. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 1997 Jun 10;117(15):2201-7.
94. Witt DM, Lousberg TR. Controversies surrounding estrogen use in postmenopausal women. *Ann Pharmacother*. 1997 Jun;31(6):745-55.
95. Subbiah MT. Estrogen replacement therapy and cardioprotection: mechanisms and controversies. *Braz J Med Biol Res*. 2002 Mar;35(3):271-6.
96. Foidart JM, Desreux J, Pintiaux A, Gompel A. Hormone therapy and breast cancer risk. *Climacteric*. 2007 Oct;10 Suppl 2:54-61.
97. Burrell BA. The replacement of the replacement in menopause: hormone therapy, controversies, truth and risk. *Nurs Inq*. 2009 Sep;16(3):212-22.
98. Palacios S. Advances in hormone replacement therapy: making the menopause manageable. *BMC Womens Health*. 2008;8:22.
99. Venglat P, Xiang D, Qiu S, Stone SL, Tibiche C, Cram D, Alting-Mees M, Nowak J, Cloutier S, Deyholos M, Bekkaoui F, Sharpe A, Wang E, Rowland G, Selvaraj G, Datla R. Gene expression analysis of flax seed development. *BMC Plant Biol*. 2011;11:74.
100. [updated 07/07/2013]; <http://www.100-gesundheitstipps.de/heilpflanze-leinsamen.html>:[
101. Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999 Jul;85(1):47-51.
102. Kao YC, Zhou C, Sherman M, Laughton CA, Chen S. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. *Environ Health Perspect*. 1998 Feb;106(2):85-92.
103. Adlercreutz H, Fotsis T, Bannwart C, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T. Determination of urinary lignans and phytoestrogen metabolites, potential antiestrogens and anticarcinogens, in urine of women on various habitual diets. *J Steroid Biochem*. 1986 Nov;25(5B):791-7.
104. Kleinman D, Karas M, Danilenko M, Arbell A, Roberts CT, LeRoith D, Levy J, Sharoni Y. Stimulation of endometrial cancer cell growth by tamoxifen is associated with increased insulin-like growth factor (IGF)-I induced tyrosine phosphorylation and reduction in IGF binding proteins. *Endocrinology*. 1996 Mar;137(3):1089-95.
105. Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM. Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst*. 1994 Apr 6;86(7):527-37.
106. Arun B, Anthony M, Dunn B. The search for the ideal SERM. *Expert Opin Pharmacother*. 2002 Jun;3(6):681-91.
107. Health NClaSAatNlo. Last Updated: 10/15/2010 Accessed on: 10/15/2010 Accessed on:

10/31/2011]:

Available

from:

<http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/estrogenreceptors>.

108. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. *Lancet*. 2005 Aug 6-12;366(9484):491-505.
109. Saso S CJ, Georgiou E, et al. Endometrial cancer. *BMJ*. 2011;343:d3954.
110. Wright JD BMN, et al. Contemporary management of endometrial cancer. *Lancet*. 2012;379:1352-60. .
111. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland (2006) – Häufigkeit und Trends. 5. überarbeitete aA, Saarbrücken.
112. Denschlag D UU EGTdatoecpacDAIEA-.
113. Petru E, Jonat W, Fink D, Köchli OR. Praxisbuch Gynäkologische Onkologie. 3. Auflage ed: Springer Verlag; 2011.
114. Robert-Koch-Instituts DzGd. 2012 [updated 2014/09/072014/09/07]; Available from: [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Gebaermutterhalskrebs/gebaermutterhalskrebs\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Gebaermutterhalskrebs/gebaermutterhalskrebs_node.html).
115. Bandera EV, Williams MG, Sima C, Bayuga S, Pulick K, Wilcox H, Soslow R, Zauber AG, Olson SH. Phytoestrogen consumption and endometrial cancer risk: a population-based case-control study in New Jersey. *Cancer Causes Control*. 2009 Sep;20(7):1117-27.
116. Burdette JE, Liu J, Lantvit D, Lim E, Booth N, Bhat KP, Hedayat S, Van Breemen RB, Constantinou AI, Pezzuto JM, Farnsworth NR, Bolton JL. *Trifolium pratense* (red clover) exhibits estrogenic effects in vivo in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *J Nutr*. 2002 Jan;132(1):27-30.
117. Medlock KL, Branham WS, Sheehan DM. The effects of phytoestrogens on neonatal rat uterine growth and development. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995 Mar;208(3):307-13.
118. Whitten PL, Russell E, Naftolin F. Influence of phytoestrogen diets on estradiol action in the rat uterus. *Steroids*. 1994 Jul;59(7):443-9.
119. Liu Z, Yang Z, Zhu M, Huo J. [Estrogenicity of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) and its effect on estrogen receptor level in human breast cancer MCF-7 cells]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2001 Mar;30(2):77-80.
120. Unfer V, Casini ML, Costabile L, Mignosa M, Gerli S, Di Renzo GC. Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertil Steril*. 2004 Jul;82(1):145-8, quiz 265.
121. Soto AM, Silvia RM, Sonnenschein C. A plasma-borne specific inhibitor of the proliferation of human estrogen-sensitive breast tumor cells (estrocolyone-I). *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992 Dec;43(7):703-12.
122. Ruth W. Methode zur Gewinnung des Leinsamenrohextrates mittels Kaltextraktion mit Methanol 2005.

123. Budzikiewicz H, Grigsby RD. Mass spectrometry and isotopes: a century of research and discussion. *Mass Spectrom Rev.* 2006 Jan-Feb;25(1):146-57.
124. Ostrowski W. Michael S. Tswett--inventor of column chromatography. (On the occasion of 65th anniversary of his lecture on the column chromatography technique). *Folia Biol (Krakow).* 1968;16(4):429-48.
125. Albertsson PA. The contribution of photosynthetic pigments to the development of biochemical separation methods: 1900-1980. *Photosynth Res.* 2003;76(1-3):217-25.
126. Quirantes-Pine R, Lozano-Sanchez J, Herrero M, Ibanez E, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. HPLC-ESI-QTOF-MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts. *Phytochem Anal.* 2013 May-Jun;24(3):213-23.
127. Barnes KA, Smith RA, Williams K, Damant AP, Shepherd MJ. A microbore high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry method for the determination of the phytoestrogens genistein and daidzein in comminuted baby foods and soya flour. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1998;12(3):130-8.
128. Gu L, Gu W. Characterisation of soy isoflavones and screening for novel malonyl glycosides using high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry. *Phytochem Anal.* 2001 Nov-Dec;12(6):377-82.
129. Grayson MA. John Bennett Fenn: a curious road to the prize. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2011 Aug;22(8):1301-8.
130. Waldschlager J, Bergemann C, Ruth W, Effmert U, Jeschke U, Richter DU, Kragl U, Piechulla B, Briese V. Flax-seed extracts with phytoestrogenic effects on a hormone receptor-positive tumour cell line. *Anticancer Res.* 2005 May-Jun;25(3A):1817-22.
131. Abarzua S, Serikawa T, Szewczyk M, Richter DU, Piechulla B, Briese V. Antiproliferative activity of lignans against the breast carcinoma cell lines MCF 7 and BT 20. *Arch Gynecol Obstet.* 2012 Apr;285(4):1145-51.
132. <http://www.reactolab.ch/Vector/ABC%20Method.htm>. Last Updated: 11/26/2013. Accessed on: 10/31/2011.
133. Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, Bamezai R, Bairwa N, Grant SG. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Biosci Rep.* 2004 Dec;24(6):631-9.
134. Small RK, Patel P, Watkins BA. Response of Muller cells to growth factors alters with time in culture. *Glia.* 1991;4(5):469-83.
135. Nishida M, Kasahara K, Kaneko M, Iwasaki H, Hayashi K. [Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors]. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 1985 Jul;37(7):1103-11.
136. Holinka CF, Hata H, Gravanis A, Kuramoto H, Gursipide E. Effects of estradiol on proliferation of



- endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa line). *J Steroid Biochem.* 1986 Nov;25(5B):781-6.
137. Gravanis A, Gurbide E. Effects of estradiol on deoxyribonucleic acid polymerase alpha activity in the Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986 Aug;63(2):356-9.
  138. Hata H, Kuramoto H. Immunocytochemical determination of estrogen and progesterone receptors in human endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa cells). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992 Apr;42(2):201-10.
  139. Croxtall JD, Elder MG, White JO. Hormonal control of proliferation in the Ishikawa endometrial adenocarcinoma cell line. *J Steroid Biochem.* 1990 May;35(6):665-9.
  140. Lessey BA, Ilesanmi AO, Castelbaum AJ, Yuan L, Somkuti SG, Chwalisz K, Satyaswaroop PG. Characterization of the functional progesterone receptor in an endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa): progesterone-induced expression of the alpha1 integrin. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996 Sep;59(1):31-9.
  141. Hackenberg R, Loos S, Nia AH, Kunzmann R, Schulz KD. Expression of placental protein 14 by the new endometrial cancer cell line MFE-280 in vitro and by endometrial carcinomas in vivo. *Anticancer Res.* 1998 Mar-Apr;18(2A):1153-8.
  142. Gehrig-Burger K, Slaninova J, Gimpl G. Depletion of calcium stores contributes to progesterone-induced attenuation of calcium signaling of G protein-coupled receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Aug;67(16):2815-24.
  143. Way DL, Grosso DS, Davis JR, Surwit EA, Christian CD. Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture. *In Vitro.* 1983 Mar;19(3 Pt 1):147-58.
  144. Köller S. Untersuchungen zum Einfluß endokrin wirksamer Umweltchemikalien auf die Primärzellkultur der Epithelzellen des humanen Endometriums. [Inauguraldissertation]. 2002:32-3.
  145. Yang JH. Expression of dioxin-responsive genes in human endometrial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Apr 13;257(2):259-63.
  146. Remmele W SK. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIS score vs. subjective grading, IRS). *Pathl Res Pract.* 1993;189:862-6.
  147. Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry.* 2002 Apr 1;47(4):236-42.
  148. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988 Sep 1;48(17):4827-33.
  149. Imai K, Ukai R, Ishikawa K, Aoki H, Kato T, Arakawa E, Marunouchi T. [In vitro cell proliferation assay method using rat gastric cultured cells and effect of anti-ulcer drugs on the proliferation of cultured cells]. *Yakugaku Zasshi.* 1994 May;114(5):316-24.

150. Wang C, Kurzer MS. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutr Cancer*. 1997;28(3):236-47.
151. Anderson JJ, Ambrose WW, Garner SC. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998 Mar;217(3):345-50.
152. Miodini P, Fioravanti L, Di Fronzo G, Cappelletti V. The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. *Br J Cancer*. 1999 Jun;80(8):1150-5.
153. Lehmann L, Esch HL, Wagner J, Rohnstock L, Metzler M. Estrogenic and genotoxic potential of equol and two hydroxylated metabolites of Daidzein in cultured human Ishikawa cells. *Toxicol Lett*. 2005 Jul 28;158(1):72-86.
154. Li HF, Duan Y, Wang LD, Tian ZF, Qiu XQ, Zhang YF, Zhang H, Yang LN. Effects of estrogen and phytoestrogens on endometrial leakage in ovariectomized rats and the related mechanisms. *Sheng Li Xue Bao*. 2013 Feb 25;65(1):8-18.
155. van Hunsel FP, Kampschoer P. [Postmenopausal bleeding and dietary supplements: a possible causal relationship with hop- and soy-containing preparations]. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2012;156(41):A5095.
156. Rajini PS, Krishnakumari MK, Majumder SK. Cytotoxicity of certain organic solvents and organophosphorus insecticides to the ciliated protozoan *Paramecium caudatum*. *Microbios*. 1989;59(240-241):157-63.
157. Goncalves K, Toigo E, Ascoli B, von Poser G, Ribeiro VL. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. *Parasitol Res*. 2007 May;100(6):1267-70.
158. Cao Z, West C, Norton-Wenzel CS, Rej R, Davis FB, Davis PJ. Effects of resin or charcoal treatment on fetal bovine serum and bovine calf serum. *Endocr Res*. 2009;34(4):101-8.
159. Chattopadhyay S, Bisaria VS, Panda AK, Srivastava AK. Cytotoxicity of in vitro produced podophyllotoxin from *Podophyllum hexandrum* on human cancer cell line. *Nat Prod Res*. 2004 Feb;18(1):51-7.
160. Bai JK, Zhao W, Li HM, Tang YJ. Novel biotransformation process of podophyllotoxin to 4 beta-sulfur-substituted podophyllum derivatives with anti-tumor activity by *Penicillium purpurogenum* Y.J. Tang. *Curr Med Chem*. 2012;19(6):927-36.
161. Ren J, Wu L, Xin WQ, Chen X, Hu K. Synthesis and biological evaluation of novel 4beta-(1,3,4-oxadiazole-2-amino)-podophyllotoxin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012 Jul 15;22(14):4778-82.
162. Chengniu W, Zhonghua W, Yu Z, Chunyan N, Xiaodong Z, Li Z. Synthesis and cytotoxicity evaluation of novel podophyllotoxin derivatives. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2011 Nov;344(11):735-40.
163. Wang JZ, Tian X, Tsumura H, Shimura K, Ito H. Antitumor activity of a new low immunosuppressive derivative of podophyllotoxin (GP-11) and its mechanisms. *Anticancer Drug Des*. 1993 Jun;8(3):193-202.

164. Heryanto B, Rogers PA. Regulation of endometrial endothelial cell proliferation by oestrogen and progesterone in the ovariectomized mouse. *Reproduction*. 2002 Jan;123(1):107-13.
165. Esch H. shikawa Zellen als in vitro Testsystem für Estrogenität: Etablierung und Anwendung auf verschiedene Klassen endokrin aktiver Substanzen 2003: Available from: <http://digbib.ubka.uni-karlsruhe.de/volltexte/documents/764145>.
166. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*. 2000 Dec;52(4):513-56.
167. Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, Wehling M. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev*. 2003 Jul;83(3):965-1016.
168. Simoncini T, Genazzani AR. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol*. 2003 Mar;148(3):281-92.
169. Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC. Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res*. 2004 Jan 1;64(1):423-8.
170. Radosevic K, Tonkovic T, Slivac I, Kniewald Z, Gaurina Srcek V. Comparison of cytotoxicity induced by 17alpha-ethynylestradiol and diethylstilbestrol in fish CCO and mammalian CHO-K1 cell lines. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2011 Mar;86(3):252-7.
171. Dickson RB, Stancel GM. Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2000(27):135-45.
172. Valbuena D, Martin J, de Pablo JL, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertil Steril*. 2001 Nov;76(5):962-8.
173. Withanage GS, Murata H, Koyama T, Ishiwata I. Agonistic and antagonistic effects of zearalenone, an estrogenic mycotoxin, on SKN, HHUA, and HepG2 human cancer cell lines. *Vet Hum Toxicol*. 2001 Feb;43(1):6-10.
174. Borras M, Hardy L, Lempereur F, el Khissiin AH, Legros N, Gol-Winkler R, Leclercq G. Estradiol-induced down-regulation of estrogen receptor. Effect of various modulators of protein synthesis and expression. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1994 Mar;48(4):325-36.
175. Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH, Jr., Pestell RG, Kushner PJ. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem*. 2002 Jul 5;277(27):24353-60.
176. Herynk MH, Hopp T, Cui Y, Niu A, Corona-Rodriguez A, Fuqua SA. A hypersensitive estrogen receptor alpha mutation that alters dynamic protein interactions. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jul;122(2):381-93.
177. Ricoul M, Dutrillaux B. Chromosome hyper-radiosensitivity in mice at the end of pregnancy. *C*

R Acad Sci III. 1991;312(13):635-9.

178. Katzenellenbogen BS. Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways. *Biol Reprod*. 1996 Feb;54(2):287-93.

179. Sutherland RL, Prall OW, Watts CK, Musgrove EA. Estrogen and progestin regulation of cell cycle progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1998 Jan;3(1):63-72.

180. Lemieux P, Fuqua S. The role of the estrogen receptor in tumor progression. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1996 Jan;56(1-6 Spec No):87-91.

181. Ciocca DR, Fanelli MA. Estrogen receptors and cell proliferation in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 1997 Oct;8(8):313-21.

182. Paschke D, Abarzua S, Schlichting A, Richter DU, Leinweber P, Briese V. Inhibitory effects of bark extracts from *Ulmus laevis* on endometrial carcinoma: an in-vitro study. *Eur J Cancer Prev*. 2009 Apr;18(2):162-8.

183. Staar S, Richter DU, Makovitzky J, Briese V, Bergemann C. Stimulation of endometrial glandular cells with genistein and daidzein and their effects on ERalpha- and ERbeta-mRNA and protein expression. *Anticancer Res*. 2005 May-Jun;25(3A):1713-8.

184. Tou JC, Chen J, Thompson LU. Flaxseed and its lignan precursor, secoisolariciresinol diglycoside, affect pregnancy outcome and reproductive development in rats. *J Nutr*. 1998 Nov;128(11):1861-8.

185. McMichael-Phillips DF, Harding C, Morton M, Roberts SA, Howell A, Potten CS, Bundred NJ. Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *Am J Clin Nutr*. 1998 Dec;68(6 Suppl):1431S-5S.

186. Parajuli B, Shin SJ, Kwon SH, Cha SD, Lee HG, Bae I, Cho CH. The synergistic apoptotic interaction of Indole-3-Carbinol and Genistein with TRAIL on endometrial cancer cells. *J Korean Med Sci*. 2013 Apr;28(4):527-33.

187. Auborn KJ, Fan S, Rosen EM, Goodwin L, Chandrasekaran A, Williams DE, Chen D, Carter TH. Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen. *J Nutr*. 2003 Jul;133(7 Suppl):2470S-5S.

188. Poonyachoti S, Deachapunya C. Modulatory effects of phytoestrogens on the expression of Fas ligand and the release of cytochrome C in normal and cancerous endometrial cells. *J Med Assoc Thai*. 2012 Dec;95 Suppl 12:S105-12.

189. Whitten PL, Lewis C, Russell E, Naftolin F. Potential adverse effects of phytoestrogens. *J Nutr*. 1995 Mar;125(3 Suppl):771S-6S.

190. Kaplanski O, Shemesh M, Berman A. Effects of phyto-oestrogens on progesterone synthesis by isolated bovine granulosa cells. *J Endocrinol*. 1981 Jun;89(3):343-8.

191. Carreau C, Flouriot G, Bennetau-Pelissero C, Potier M. Enterodiol and enterolactone, two major diet-derived polyphenol metabolites have different impact on ERalpha transcriptional activation in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008 May;110(1-2):176-85.

192. Milder IE, Feskens EJ, Arts IC, Bueno-de-Mesquita HB, Hollman PC, Kromhout D. Intakes of 4 dietary lignans and cause-specific and all-cause mortality in the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr.* 2006 Aug;84(2):400-5.
193. Milder IE, Arts IC, van de Putte B, Venema DP, Hollman PC. Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *Br J Nutr.* 2005 Mar;93(3):393-402.
194. Bambagiotti-Alberti M, Coron SA, Ghiara C, Moreti G, Raffaelli A. Investigation of mammalian lignan precursors in flax seed: first evidence of secoisolariciresinol diglucoside in two isomeric forms by liquid chromatograph/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1994 Dec;8(12):929-32.
195. Thangavelu G, Colazo MG, Oba M, Dyck MK, Okine EK, Ambrose DJ. Fecal and urinary lignans, intrafollicular estradiol, and endometrial receptors in lactating dairy cows fed diets supplemented with hydrogenated animal fat, flaxseed or sunflower seed. *J Reprod Dev.* 2008 Dec;54(6):439-46.
196. Bitto A, Granese R, Triolo O, Villari D, Maisano D, Giordano D, Altavilla D, Marini H, Adamo EB, Nicotina PA, D'Anna R, Squadrito F. Genistein aglycone: a new therapeutic approach to reduce endometrial hyperplasia. *Phytomedicine.* 2010 Sep;17(11):844-50.
197. Serraino M, Thompson LU. The effect of flaxseed supplementation on early risk markers for mammary carcinogenesis. *Cancer Lett.* 1991 Nov;60(2):135-42.
198. Badowski P, Urbanek-Karlowska B. [Phytoestrogens in food--a review]. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2001;52(3):203-12.
199. Adlercreutz H. Lignans and human health. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2007;44(5-6):483-525.
200. Mason JK, Fu MH, Chen J, Yu Z, Thompson LU. Dietary flaxseed-trastuzumab interactive effects on the growth of HER2-overexpressing human breast tumors (BT-474). *Nutr Cancer.* 2013;65(3):451-9.
201. Lowcock EC, Cotterchio M, Boucher BA. Consumption of flaxseed, a rich source of lignans, is associated with reduced breast cancer risk. *Cancer Causes Control.* 2013 Apr;24(4):813-6.
202. Dew TP, Williamson G. Controlled flax interventions for the improvement of menopausal symptoms and postmenopausal bone health: a systematic review. *Menopause.* 2013 Nov;20(11):1207-15.
203. Colli MC, Bracht A, Soares AA, de Oliveira AL, Boer CG, de Souza CG, Peralta RM. Evaluation of the efficacy of flaxseed meal and flaxseed extract in reducing menopausal symptoms. *J Med Food.* 2012 Sep;15(9):840-5.
204. Bedell S, Nachtigall M, Naftolin F. The pros and cons of plant estrogens for menopause. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 Jan;139:225-36.
205. Neill AS, Ibiebele TI, Lahmann PH, Hughes MC, Nagle CM, Webb PM. Dietary phyto-oestrogens and the risk of ovarian and endometrial cancers: findings from two Australian case-control studies. *Br J Nutr.* 2014 Apr 28;111(8):1430-40.

## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Syntheseweg der steroidalen Sexualhormone .....	4
Abb. 2 Strukturformeln von endogenen Östrogenen.....	8
Abb. 3 SERM-Aktivität auf ER in unterschiedlichen Geweben.....	12
Abb. 4 Schichten des Uterus .....	13
Tab. 1 Molare Massen der Isoflavone und Lignane des Leinsamenrohextraktes .....	25
Abb. 5 Schematische Darstellung des Vectastain-Elite-ABC-Kits .....	27
Abb. 6 Zählnetz nach Bürker .....	30
Abb. 7 Lösungsmiteleinfluss im BrdU-Test.....	38
Abb. 8 Lösungsmiteleinfluss im MTT-Test.....	39
Abb. 9 Einfluss DMSO 0,1 % im BrdU-Test.....	40
Abb. 10 Einfluss DMSO 0,1 % im MTT-Test.....	40
Tab. 2 Übersicht der identifizierten Lignane und Isoflavone des Leinsamenrohextraktes mittels High Performance Liquid Chromatography-Massenspektrometrie .....	41
Abb. 11 Zelllinie Ishikawa.....	42
Abb. 12 Zelllinie RL95-2 .....	43
Abb. 13 Zelllinie MFE-280.....	43
Tab. 3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung zur Darstellung der Rezeptorexpression der drei verwendeten Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa, RL95-2 und MFE-280 .....	44
Abb. 14 MTT-Test Ishikawa mit Leinsamenrohextrakt .....	46
Abb. 15 MTT-Test RL95-2-Zellen mit Leinsamenrohextrakt.....	47
Abb. 16 MTT-Test MFE-280-Zellen mit Leinsamenrohextrakt .....	48
Tab. 4 MTT-Test mit Leinsamenrohextrakt .....	49
Abb. 17 MTT-Test Ishikawa-Zellen mit den Lignanzen .....	50
Tab. 5 MTT-Test an Ishikawa.....	50
Abb. 18 MTT-Test RL95-2-Zellen mit den Lignanzen.....	52
Tab. 6 MTT-Test an RL95-2 .....	52
Abb. 19 MTT-Test MFE-280-Zellen mit den Lignanzen .....	54
Tab. 7 MTT-Test an MFE-280.....	54
Tab. 8 MTT-Test .....	55
Abb. 20 BrdU-Test Ishikawa mit Leinsamenrohextrakt.....	57
Abb. 21 BrdU-Test RL95-2-Zellen mit Leinsamenrohextrakt.....	58
Abb. 22 BrdU-Test MFE-280-Zellen mit Leinsamenrohextrakt .....	59
Tab. 9 BrdU-Test mit Leinsamenrohextrakt.....	60
Abb. 23 BrdU-Test Ishikawa-Zellen mit Lignanzen.....	61

<b>Tab. 10 BrdU-Test an Ishikawa.....</b>	<b>61</b>
<b>Abb. 24 BrdU-Test RL95-2-Zellen mit Lignanen .....</b>	<b>63</b>
<b>Tab. 11 BrdU-Test an RL95-2 .....</b>	<b>63</b>
<b>Abb. 25BrdU-Test MFE-280-Zellen mit Lignanen.....</b>	<b>65</b>
<b>Tab. 12 BrdU-Test an MFE-280.....</b>	<b>65</b>
<b>Tab. 13 BrdU-Test .....</b>	<b>66</b>
<b>Tab. 14 Zusammenfassung der Ergebnisse der MTT- und BrdU-Tests.....</b>	<b>68</b>
<b>Tab. 15 Intertest-Validität .....</b>	<b>69</b>
<b>Tab. 16 Inter-Zelllinien-Validität .....</b>	<b>71</b>
<b>Tab. 17 Effektrichtung der unterschiedlichen Konzentrationen der Proben.....</b>	<b>73</b>

## Danksagung

Meinem Doktorvater, dem stellvertretenden Leiter der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikums Südstadt und Leiter des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik, Herrn Prof. Dr. med. V. Brieser gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit die vorliegende Dissertation zu verfassen. Sein fachliches Interesse, das entgegengebrachte Vertrauen sowie die konstruktiven Diskussionen und Beiträge trugen wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit bei.

Frau Dr. rer. nat. C. Bergemann danke ich für die kollegiale Arbeitsatmosphäre, die Betreuung und besonders für das offene Ohr in der Anfangszeit

Frau Dr. rer. nat. D.-U. Richter danke ich für die gute Zusammenarbeit sowie die Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Frau PD Dr. rer. nat. S. Abarzua aus dem Institut für Biowissenschaften danke ich für das Überlassen des Leinsamen.

Herrn Dr. rer. nat. W. Ruth aus dem Institut für Chemie danke ich für die Anleitung bei der Herstellung des Rohextrakts sowie für die Unterstützung bei der Analyse des Extraktes mittels HPLC-Massenspektrometrie.

Bedanken möchte ich mich bei meiner Freundin Imke für den Einsatz beim Korrekturlesen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Cousine Minela und meiner Nichte Jasmin für ihre Babysitterdienste.

Mein herzlichstes Dankeschön widme ich meiner Familie und ganz besonders meinem Mann und meinen beiden Kindern für ihre liebevoll Unterstützung, die Zuversicht auf dem Weg zur Dissertation und die lange Zeit des Entbehrens.